

**Université de Sherbrooke**

Modulation de l'expression du facteur angiogénique VEGF (vascular endothelial growth factor)  
par les cysteinyl-leucotriènes

par

Sébastien Poulin

Département de Pédiatrie, Service d'Immunologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé

en vue de l'obtention du grade de

maître ès sciences (M.Sc.) en Immunologie

Janvier 2010

Dr. Marek Rola-Pleszczynski, Immunologie

Dre. Claire M. Dubois, Immunologie

Dr. André Cantin, Pneumologie

Dr. Pierre Larivée, Pneumologie



Library and Archives  
Canada

Published Heritage  
Branch

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file* *Votre référence*  
*ISBN: 978-0-494-61492-1*  
*Our file* *Notre référence*  
*ISBN: 978-0-494-61492-1*

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

■+■  
**Canada**

## **Table des Matières**

Table des matières .....	I
Liste des illustrations (tableaux et figures) .....	VI
Liste des sigles, abréviations et symboles .....	VII
Résumé .....	IX
1- INTRODUCTION .....	1
Partie 1 : L'asthme .....	1
1.1 Historique .....	1
1.2 Épidémiologie .....	1
1.3 Définition et classification.....	1
1.4 Pathophysiologie de l'asthme allergique.....	2
1.4.1 L'inflammation de type Th2 dans l'asthme.....	3
1.4.2 L'«Epithelial-mesenchymal trophic unit» (EMTU) .....	7
1.5 Le remodelage des voies respiratoires.....	9
1.5.1 Définition.....	9
1.5.2 Pathophysiologie .....	10

1.5.2.1 Le modèle linéaire .....	11
1.5.2.2 Le modèle parallèle .....	12
1.5.3 Conséquences .....	13
1.5.3.1. Rôles de l'angiogenèse .....	14
1.5.4 Traitements .....	14
Partie 2 : Les cysteinyl-leucotriènes (cysLTs).....	15
2.1 Historique .....	15
2.2 Synthèse.....	16
2.2.1. Profil d'expression.....	16
2.2.2. Biosynthèse classique.....	17
2.2.3. Biosynthèse transcellulaire.....	20
2.2.4. Catabolisme .....	20
2.3 Récepteurs .....	21
2.3.1. Cysteinyl leukotriene receptor 1 (CysLT1).....	21
2.3.2. Cysteinyl leukotriene receptor 2 (CysLT2).....	23
2.3.3. GPR17 .....	24
2.3.4. Autres.....	25

2.3.5. Immunomodulation .....	25
2.3.6. Localisation périnucléaire.....	26
2.3.7. Formation d'homo- ou hétérodimères .....	27
2.4 Transduction du signal .....	27
2.4.1. via CysLT1 .....	28
2.4.2. via CysLT2 .....	29
2.4.3. Les protéines G.....	30
2.4.4. Les petites protéines G .....	31
2.4.5. Les MAPKs .....	32
2.4.5.1. ERKs.....	33
2.4.5.2. JNKs .....	34
2.4.5.3. p38 .....	34
2.4.6. Les PKCs .....	35
2.4.7. PI3K.....	35
2.5 Implications dans la pathophysiologie de l'asthme.....	36
2.6 Rôles dans le remodelage .....	38
2.6.1. Au niveau de l'angiogenèse.....	39

2.7 Liens entre les cysLTs et le VEGF .....	40
Partie 3 : Le VEGF (vascular endothelial growth factor) .....	40
3.1 Historique .....	40
3.2 Famille du VEGF .....	41
3.2.1 VEGF-A.....	41
3.2.1.1. Profil d'expression.....	42
3.2.1.2. Angiogenèse et autres fonctions.....	43
3.2.2 Autres membres.....	46
3.3 Récepteurs .....	47
3.3.1 VEGFR1 (Flt-1).....	48
3.3.2 VEGFR2 (KDR).....	49
3.3.3 VEGFR3 (Flt-4).....	49
3.3.4 Co-récepteurs.....	50
3.4 Modulation du VEGF .....	51
3.4.1 Facteurs régulant le VEGF .....	51
3.4.2 Régulation transcriptionnelle.....	52
3.4.2.1. HIF-1 .....	53

3.4.2.1.1. Régulation en hypoxie.....	54
3.4.2.1.2. Régulation en normoxie .....	55
3.4.2.2. Sp1 .....	55
3.4.2.2.1. Modifications post-traductionnelles .....	57
3.4.2.2.2. Interactions avec d'autres protéines .....	58
3.4.2.3. AP-1 .....	59
3.4.2.3.1 Jun .....	60
3.4.2.3.2. Fos .....	61
3.4.2.4. Autres .....	61
3.4.3 Régulation post-transcriptionnelle.....	62
3.4.4 Régulation de la traduction.....	63
3.5 Implication du VEGF dans l'angiogenèse du remodelage.....	64
2- AVANT PROPOS DE L'ARTICLE .....	65
3- RÉSUMÉ DE L'ARTICLE .....	68
4- ARTICLE.....	70
5- DISCUSSION .....	114
6- CONCLUSION.....	131
7- REMERCIEMENTS.....	133
8- LISTE DES RÉFÉRENCES .....	134

## Liste des illustrations (tableaux et figures)

<u>Figure 1</u> : Remodelage des voies respiratoires dans l'asthme.....	9
<u>Figure 2</u> : Pathophysiologie du remodelage des voies respiratoires dans l'asthme .....	11
<u>Figure 3</u> : Conséquences du remodelage des voies respiratoires dans l'asthme .....	13
<u>Figure 4</u> : Biosynthèse et sites d'action des différents leucotriènes.....	18
<u>Tableau 1</u> : Principales différences entre les récepteurs CysLT1 et CysLT2 .....	21
<u>Figure 5</u> : Interactions entre les leucotriènes et cytokines (immunomodulation) .....	25
<u>Figure 6</u> : Les voies des MAPKs.....	32
<u>Figure 7</u> : Étapes de l'angiogenèse.....	43
<u>Figure 8</u> : Voies de signalisation et facteurs impliqués dans la modulation du VEGF.....	51
<u>Figure 9</u> : Modulation de l'activité de Sp1 .....	57
<u>Tableau 2</u> : Superactivation de Sp1 .....	59



**Liste des sigles, abréviations et symboles**

5-LO : 5-lipoxygénase

ADAM : a desintegrin and metalloproteinase domain

AP-1 : activator protein-1

CMLBs : cellules musculaires lisses bronchiques

cPLA<sub>2</sub> : cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>

CRE : cAMP responsive element

CysLT1 : cysteinyl leukotriene receptor 1

CysLT2 : cysteinyl leukotriene receptor 2

cysLTs : cysteinyl-leucotriènes

DAG : diacylglycérol

ERK : extracellular signal-regulated kinase

ETMU : epithelial-mesenchymal trophic unit

FLAP : 5-lipoxygenase activating protein

Flt-1 : fms-related tyrosine kinase 1

Flt-4 : fms-related tyrosine kinase 4

GPCR : G protein-coupled receptor

GPR17 : G protein-coupled receptor 17

HEK : human embryonic kidney cells

HEKLT1 : HEK transfectée d'une façon stable avec le récepteur CysLT1

HEKLT2 : HEK transfectée d'une façon stable avec le récepteur CysLT2

HEKPAFR : HEK transfectée d'une façon stable avec le récepteur PAFR

HIF-1 : hypoxia-inducible-factor-1

IFN : interféron

InsP<sub>3</sub> : inositol triphosphate

JNK : Jun N-terminal kinase

KDR : kinase insert domain-containing receptor

MAPK : mitogen-activated protein kinase

MEK : MAPK/ERK kinase

NP-1,-2 : neuropiline-1, -2

PAF : platelet-activating factor

PKA : protein kinase A

PKC : protein kinase C

PI3K : phosphatidylinositol-3-kinase

PIP<sub>2</sub> : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PIP<sub>3</sub> : phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate

PTX : pertussis toxin

ROS : reactive oxygen species

Sp1 : specificity protein 1

SRE : serum response element

SRS : slow reaction smooth muscle-stimulating substance

SRS-A : slow-reacting substance of anaphylaxis

STAT : signal transducers and activator of transcription

TLRs : toll-like receptors

TNF : tumor necrosis factor

VEGF : vascular endothelial growth factor

VEGFR : vascular endothelial growth factor receptor

VEMS : volume expiratoire maximal par seconde

## Résumé

Les cysteinyl-leucotriènes (cysLTs) ont des rôles majeurs dans la pathophysiologie de l'asthme et sont impliqués dans le remodelage des voies respiratoires, un processus caractérisé par plusieurs changements structuraux incluant entre autre la fibrogenèse et l'hyperplasie des cellules musculaires lisses. Dans cette étude, nous avons investigué le rôle potentiel des cysLTs dans la modulation du « vascular endothelial growth factor » (VEGF), un facteur de croissance connu pour être important dans une autre facette du remodelage, c'est-à-dire l'angiogenèse. Nous avons montré que le LTD<sub>4</sub> induit l'expression du VEGF chez les monocytes humains et les cellules musculaires lisses bronchiques humaines avec une inhibition complète par un antagoniste spécifique du récepteur CysLT1. De plus, des cellules de reins embryonnaires humaines (HEK-293) transfectées d'une façon stable avec CysLT1 ont été utilisées pour étudier la régulation transcriptionnelle du promoteur du VEGF. La stimulation de ces cellules avec des cysLTs mène à l'activation du promoteur du VEGF d'une façon dépendante de la concentration et résistante à la *Bordetella pertussis toxin* (PTX). Aussi, il en résulte une augmentation de l'expression de l'ARNm et de la protéine du VEGF d'une façon dépendante du temps de stimulation. L'utilisation de mutants tronqués en 5' de la construction du promoteur du VEGF de type sauvage démontre que la région en amont de -90 Pb n'est pas requise pour sa régulation transcriptionnelle par les cysLTs. De plus, un prétraitement avec des inhibiteurs pharmacologiques des MAPKs suggère l'implication de JNK et ERK, mais pas de p38 dans l'activation du promoteur du VEGF par LTD<sub>4</sub>. Également, l'inhibition partielle de l'activation du promoteur du VEGF via la surexpression des formes dominantes négatives des protéines JunD, FosB et Ras suggère un rôle actif pour le complexe AP-1. Cependant, puisqu'un mutant du promoteur avec des substitutions dans le site de liaison d'AP-1 maintient toujours sa

transactivation par LTD<sub>4</sub>, le complexe AP-1 semble agir d'une façon indirecte. En fait, l'inhibition complète de l'activation du promoteur du VEGF et de l'augmentation subséquente de son ARNm par un prétraitement avec la mithramycine, un inhibiteur de la transcription Sp1-dépendante, suggère que AP-1 pourrait agir indirectement sur Sp1 pour la modulation du VEGF par les cysLTs. Par surcroît, des expériences utilisant un promoteur du VEGF (-123 +50 pb) avec tous ses sites Sp1 mutés (4) ont montré que ces régions étaient nécessaires à la transactivation du VEGF par LTD<sub>4</sub>. Bref, nos résultats indiquent pour la première fois que les cysLTs peuvent activer transcriptionnellement la production du VEGF via le récepteur CysLT1, avec l'implication de JNK, ERK, AP-1 et Sp1. Ces résultats proposent que les cysLTs pourraient être importants dans le processus d'angiogenèse associé au remodelage des voies respiratoires et indiquent un possible bénéfice jusqu'à maintenant insoupçonné dans l'utilisation des antagonistes des récepteurs CysLT1 dans la prévention ou le traitement du remodelage dans l'asthme.

Mots clés généraux : cysLTs, VEGF, remodelage, asthme, signalisation

## **1- INTRODUCTION**

### **Partie 1 : L'ASTHME**

#### **1.1 Historique**

L'asthme est une maladie probablement présente chez l'humain depuis des milliers d'années. La première utilisation du mot «asthme» se retrouve dans le *Corpus Hippocraticum* initié par Hippocrate (460-375 B.C.) mais référait probablement à un symptôme plutôt qu'à une maladie. En fait, le mot «asthme» provient du verbe grecque «aazein» signifiant «respirer rapidement et peu profondément» (MARKETOS et BALLAS, 1982). La première description de l'asthme comme entité clinique est accordée à Aretaeus de Cappadoce (81-138 A.D). De l'antiquité jusqu'à aujourd'hui, cette maladie semble toujours avoir accompagnée les hommes (COHEN, 1992).

#### **1.2 Épidémiologie**

Présentement, l'asthme est reconnue comme étant une cause majeure d'hospitalisation et de perte de qualité de vie, en plus d'être un important fardeau économique pour le système de santé du Canada (Statistique Canada, *Rapports sur la santé*, Vol 16, No2, Mars 2005). Selon l'Organisation mondiale de la santé, plus de 150 millions de personnes sont atteintes à travers le monde, et selon Statistique Canada environ 10% de la population canadienne est touchée. Bien que le taux de mortalité soit en diminution, la prévalence de l'asthme est en constante augmentation au Canada depuis les 20 dernières années. Mis à part la possibilité d'un surdiagnostic causé par la sous-utilisation de tests objectifs comme la spirométrie (AARON *et al.*, 2008), les raisons expliquant l'augmentation de sa prévalence sont majoritairement inconnues (Asthma Society of Canada, *Fact sheet No1*, Avril 2005).

#### **1.3 Définition et classification**

L'asthme peut être décrit comme étant une maladie inflammatoire chronique des voies respiratoires pouvant mener à des épisodes de sibilances, de dyspnée, de toux et de sensation d'oppression thoracique chez les personnes susceptibles. Ces épisodes sont associés avec un degré variable d'obstruction des voies respiratoires étant le plus souvent réversible spontanément ou avec médication. Les patients asthmatiques démontrent également un état d'hyper-réactivité trachéo-bronchique face à une grande variété de stimuli (MURRAY et NADEL, 2005). Fait important, l'asthme est une maladie extrêmement hétérogène pouvant varier en terme des stimuli impliqués, de l'âge d'apparition, de l'immunopathologie, de la réponse aux traitements, de la sévérité des symptômes et du degré de chronicité (BUSSE et LEMANSKE, 2001, HOLGATE, 2008, KILEY *et al.*, 2007). En fait, l'asthme ne serait pas une maladie unique, mais un ensemble de différents désordres avec des phénotypes semblables (HOLGATE, 2008). Plusieurs différents types d'asthme ont été décrits dans la littérature mais malheureusement, il n'y a pas encore de classification simple acceptée par tous. Notons par exemple des classifications cliniques basées sur la sévérité, sur le traitement (asthme stéroïde-dépendant, asthme stéroïde-résistant), les marqueurs d'inflammation (éosinophilique, neutrophilique, inflammatoire mixte, paucigranulocytaire), le stimulus impliqué dans le déclenchement des crises (asthme induit par l'exercice, l'asthme nocturne, l'asthme induit par des médicaments et l'asthme induite par le froid). Enfin, certaines classifications prennent en compte la pathophysiologie; l'asthme allergique (extrinsèque ou éosinophilique) ou l'asthme non-allergique (intrinsèque ou non-éosinophilique) (HALDAR et PAVORD, 2007, HOLGATE, 2008, MURRAY et NADEL, 2005). Le type d'asthme le plus commun est l'asthme allergique puisqu'il représenterait environ 70% des cas (MEYER *et al.*, 2008).

#### **1.4 Pathophysiologie de l'asthme allergique**

L'asthme est un bon exemple de maladie multifactorielle complexe puisqu'il est déclenché par

l'interaction entre la génétique d'un individu et son environnement. En date de 2008, plus de 100 gènes ont été rapportés comme étant associés avec l'asthme ou des phénotypes reliés (ZHANG *et al.*, 2008). Certains de ces gènes sont reliés avec l'inflammation de type Th2 (ex : IL-13) tandis que d'autres ne semblent pas avoir de lien direct avec ce celle-ci et sont plutôt des gènes de l'épithélium, du mésenchyme ou autres (ex : ADAM-33, disintegrin, filaggrin, S100). Initialement considéré presque uniquement comme une maladie allergique d'hypersensibilité de type I dominée par une inflammation de type Th2, il est donc de plus en plus évident que d'autres facteurs comme les interactions épithélium-mésenchymes sont importantes dans sa pathogenèse (HOLGATE *et al.*, 2000, KNIGHT *et al.*, 2004). Il est aussi probable que d'autres types de lymphocytes T comme les CD4<sup>+</sup> Th1 (particulièrement dans l'asthme sévère), Th17, Treg et les CD1d-restricted NKT cells ont un rôle à jouer dans l'asthme, mais d'une façon moins importante que les Th2. Aussi, le rôle des cellules NK, des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et des lymphocytes T $\gamma\delta$  reste à clarifier (MEDOFF *et al.*, 2008, MEYER *et al.*, 2008).

#### 1.4.1 L'inflammation de type Th2 dans l'asthme

L'inflammation bronchique est d'une importance capitale dans l'asthme étant donné que les aspects physiologiques et cliniques dériveraient en grande partie de l'état inflammatoire subaigu persistant (ROBBINS, 2002). D'abord largement limité aux voies respiratoires conductrices sans alvéole, l'inflammation peut s'étendre jusqu'aux alvéoles en cas d'asthme chronique et sévère (KRAFT, 1999).

Chez une personne susceptible, il y aurait d'abord sensibilisation à des allergènes présents dans l'environnement. Pour ce faire, il doit y avoir capture et apprêtement de ces allergènes par des cellules dendritiques situées dans l'épithélium ou la sous-muqueuse bronchique avec l'aide de leur dendrites s'étendant jusqu'à la surface de contact avec l'air (VON GARNIER *et al.*, 2005). L'apprêtement de l'allergène se fait via la voie de dégradation extracellulaire et est

présentée via le CMH de classe II (RIESE et CHAPMAN, 2000). Après le contact avec l'allergène, la cellule dendritique reçoit un signal (ex : chimiokines CCL19 et CCL21 liant le récepteur CCR7) qui l'incite à migrer dans des ganglions lymphatiques locaux où le contact avec des lymphocytes T naïfs aura lieu (HUMRICH *et al.*, 2006). À cette étape, c'est la voie de différenciation utilisée par le lymphocyte CD4<sup>+</sup> naïf qui est cruciale. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs peuvent aller vers l'anergie (tolérance) ou se différencier en lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th1, Th2, Th17 ou Treg selon le contexte cellulaire et les médiateurs présents (DONG, 2008). C'est cependant les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th2 qui sont cruciaux dans les réactions d'hypersensibilité de type I comme l'asthme allergique (HOLGATE, 2008). Les cytokines importantes pour la différenciation en CD4<sup>+</sup> Th2 *in vitro* sont particulièrement IL-4 et TSLP mais leur importance relative *in vivo* ou leur source cellulaire n'est pas encore bien comprise (SOKOL *et al.*, 2008). Une fois que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th2 allergène-spécifique sont produits dans les ganglions régionaux, ils migrent vers les voies respiratoires via des interactions lipides chimioattractants/récepteurs (ex : LTB<sub>4</sub> et PGD<sub>2</sub> via BLT1 et CRTH2 respectivement) ou de multiples interactions chimiokines/récepteurs. Les cellules T CD4<sup>+</sup> Th2 effectrices (ou mémoires effectrices) auront ensuite un rôle central dans la pathophysiologie de l'asthme, tout comme les cellules T mémoires centrales qui restent dans les ganglions lymphatiques (MEDOFF *et al.*, 2008). Puisqu'ils sécrètent IL-4 et IL-13, les lymphocytes T activés sont importants dans la commutation isotypique des lymphocytes B vers la synthèse des IgE (anticorps cruciaux dans une hyper-réactivité de type I). Ces anticorps se fixent ensuite d'une façon irréversible sur les récepteurs de haute affinité FcRI à la surface des mastocytes et basophiles ce qui «sensibilise» l'hôte à l'allergène concerné (HOLGATE, 2008). Dans une moindre mesure, IgE peut aussi lier le récepteur de faible affinité FcRIII à la surface des lymphocytes B, macrophages ou éosinophiles. En produisant IL-5, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th2 aident aussi à la différenciation des éosinophiles, leur maturation, leur activation, leur



prolifération et leur migration (BARNES, 2008, HOLGATE, 2008). De plus, les cytokines comme IL-4, IL-9, IL-10 et IL-13 sont appelées «facteurs de croissance pour mastocytes» parce qu'ils ont des actions de synergie avec SCF pour la prolifération et la différenciation des mastocytes (MARONE *et al.*, 2005).

Lorsqu'une personne est sensibilisée à un allergène, la réexposition à celui-ci résulte en une exacerbation de l'inflammation sous base allergique. Premièrement, il y a une phase précoce (presque immédiate et durant environ 30-60 minutes) dû à l'interaction de l'allergène avec des cellules de l'immunité innée; majoritairement les mastocytes mais aussi les basophiles, macrophages et éosinophiles (MEDOFF *et al.*, 2008, ROBBINS, 2002). Les mastocytes, en plus d'être présent sous la membrane basale à proximité de l'épithélium bronchique, des cellules à goblet et près des vaisseaux sanguins, se retrouvent également à des endroits stratégiques pour la pathogenèse de l'asthme. En effet, chez les patients asthmatiques uniquement, ils sont également retrouvés dans la couche de cellules musculaires lisses (particulièrement les mastocytes<sup>Tryptase+/Chymase+</sup>) et dans les glandes à mucus. Ils peuvent donc interagir plus facilement avec ses deux types de cellules (BRADDING *et al.*, 2006). Les mastocytes sont activés via le «crosslink» des récepteurs de haute affinité FcRI (liant IgE) par la liaison antigène multivalent : IgE ce qui résulte en la relâche de médiateurs déjà formés et/ou déjà emmagasinés dans des granules (ex : histamine et la tryptase). Aussi, il y a synthèse de nouveaux médiateurs comme des médiateurs lipidiques (ex : cysLTs, PGD<sub>2</sub>, PAF), des cytokines (ex : IL-4, IL-5, IL-13, TNF- $\alpha$ ) et des chimiokines. D'autres moyens d'activer les mastocytes sont également possibles comme par exemple via des cytokines (ex :TNF- $\alpha$ ), via le complément C5a, l'adénosine, différents TLRs, des neuropeptides, l'hyperosmolalité et bien d'autres (BARNES, 2008, BRADDING *et al.*, 2006). Fait intéressant, les mastocytes des patients asthmatiques démontrent même un phénotype d'activation chronique (BRADDING *et al.*, 2006). Classiquement, l'activation des mastocytes dans la réponse précoce a été montré comme étant impliquée dans la

bronchoconstriction, l'augmentation de la perméabilité vasculaire, l'augmentation de la sécrétion de mucus, la vasodilatation et l'agrégation/activation de plaquette via les différents médiateurs relâchés. Cette activation a également pour conséquence de préparer la phase suivante (tardive) en relâchant des médiateurs responsables de l'arrivée de différents types cellulaires; lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th2 (ex : via cytokines Th2 induisant chimiokines STAT6-inductibles), éosinophiles (ex : via LTB<sub>4</sub>, IL-5), neutrophiles (ex : via IL-8) (BRADDING *et al.*, 2006, MEDOFF *et al.*, 2008). Le TNF- $\alpha$  relâché par les mastocytes active d'ailleurs l'endothélium ce qui aide à la migration de ces cellules. L'IL-4 relâché par les mastocytes aurait également un rôle important à jouer étant donné qu'elle est capable d'augmenter la commutation isotypique vers IgE (ROBBINS, 2002).

Pour la survenue de la phase tardive (après quelques heures et durant quelques heures) de l'exacerbation, les cellules dendritiques présentent l'allergène aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th2 effectrices (ou effectrices mémoires) des voies respiratoires ce qui résulte en leur activation ou réactivation. Par surcroît, les cellules dendritiques peuvent présenter de nouveau l'allergène aux cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires centrales ou naïves des ganglions lymphatiques régionaux menant au recrutement de nouveaux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th2 qui contribue à la phase tardive (MEDOFF *et al.*, 2008). En fait, le relâchement des médiateurs des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th2 peut causer des dommages à l'épithélium, augmenter l'inflammation et augmenter l'activation/migration/différenciation des précurseurs de mastocytes ce qui intensifie la réponse initiale. Cependant, même si les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th2 sont les chefs d'orchestres de la phase tardive, les éosinophiles sont les principaux leucocytes recrutés à cette étape via par exemple leur récepteur CCR3 et les chimiokines STAT6-dépendante CCL11 (eotaxin), CCL24 (eotaxin-2) et CCL26 (eotaxin-3) (HOLGATE, 2008, MEDOFF *et al.*, 2008, ROBBINS, 2002). Les eosinophiles causent des dommages épithéliaux avec la relâche de MBP (major basic protein), ECP (eosinophil cationic protein), eosinophil peroxydase et des ROS. Ces cellules

produisent également différents médiateurs qui amplifient et soutiennent l'inflammation, comme le PAF, les  $\text{cysLTs}$ ,  $\text{PGI}_2$ , des nombreuses cytokines et chimiokines. Certains basophiles, macrophages et neutrophiles sont aussi recrutés pendant cette phase mais leur rôle reste encore imprécis (HOLGATE, 2008, ROBBINS, 2002).

L'état inflammatoire chronique des voies respiratoires de l'asthmatique résulte de la production de cytokines, chimiokines, molécules d'adhésion, médiateurs lipidiques et autres médiateurs inflammatoires provenant directement (ou via l'interaction) entre les lymphocytes T  $\text{CD4}^+$  Th2, les cellules inflammatoires recrutés et des cellules structurales des poumons (cellules endothéliales, cellules épithéliales, fibroblastes, cellules musculaires lisses) (BUSSE et LEMANSKE, 2001, HOLGATE, 2008). En fait, plus de cent médiateurs inflammatoires et autres produits ont été cités dans la littérature (ZHANG *et al.*, 2008). Actuellement, les rôles des lymphocytes T  $\text{CD4}^+$  Th2, cellules dendritiques, mastocytes et éosinophiles sont beaucoup mieux compris que ceux des basophiles, monocytes/macrophages et neutrophiles. Pour les neutrophiles, ils semblent être plus importants dans l'asthme sévère et chronique (HALDAR et PAVORD, 2007). Bref, cet état inflammatoire sous base immunologique aurait un rôle à jouer dans les signes et symptômes de l'asthme tels l'hyper-réactivité bronchique (relâches de médiateurs bronchoconstricteur), l'hyper-sécrétion de mucus, l'éosinophilie et le remodelage des voies respiratoire (BUSSE et LEMANSKE, 2001).

#### 1.4.2. Epithelial-mesenchymal trophic unit (EMTU)

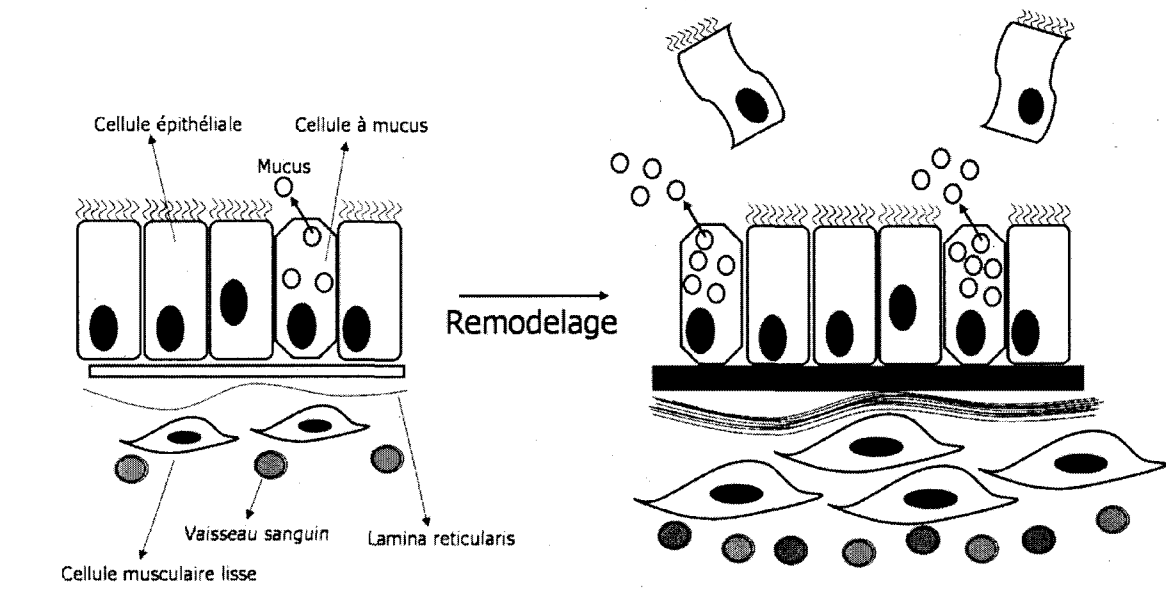
Une caractéristique fondamentale de l'asthme allergique est la capacité de sensibilisation à des aéroallergènes chez les personnes susceptibles. Puisqu'environ 40% de la population est atopique et que seulement environ 7% développent de l'asthme, une question importante se pose : quel est le mécanisme responsable de l'expression ou non de l'atopie sous forme d'asthme ? (HOLGATE, 2008) Aussi, puisque certains asthmatiques sont plus ou moins

sensibles aux corticostéroïdes, qu'elle est la base pathophysiologique de ce fait? Les réponses pourraient bien se trouver dans l'épithélium bronchique et le mésenchyme (KNIGHT *et al.*, 2004). Chez les asthmatiques; l'épithélium serait plus fragile (se détache plus facilement), plus perméable, moins efficace contre la défense antivirale et moins efficace contre la protection des agents oxydatifs. L'épithélium bronchique surexprime également EGFRs et démontre des troubles de prolifération, ce qui laisse croire qu'il serait chroniquement blessé et incapable de bien se réparer (HOLGATE, 2008, HOLGATE *et al.*, 2000). La formation d'un «cycle blessure/guérison chronique» aurait donc lieu dû à une communication inadéquate entre l'épithélium et le mésenchyme pulmonaire. Ainsi, c'est dans ce scénario que repose la théorie du «epithelial-mesenchymal trophic unit» puisqu'en essayant de réparer continuellement les dommages, ces interactions dirigent la sécrétion de nombreuses cytokines, chimiokines et facteurs de croissances comme par exemple EGF, amphiregulin, PGDF, FGF-1, FGF-2, TGF- $\beta$  et bien d'autres. Puisque les médiateurs impliqués sont semblables à ceux de la morphogénèse des poumons chez le fœtus en développement, le terme «epithelial mesenchymal trophic unit» a été choisi (HOLGATE *et al.*, 2000). Premièrement, ces différents médiateurs et leurs effets directs ou indirects pourraient expliquer en partie le phénomène de remodelage des voies respiratoires. Ensuite, les cycles de blessures/guérisons chroniques et le remodelage pourraient servir de base et de soutien à l'installation de l'inflammation chronique de l'asthme en créant un microenvironnement propice. Bref, un défaut de susceptibilité inné ou acquis de l'épithélium bronchique en présence d'agents nocifs de l'environnement réactiverait l'EMTU et mènerait à un cycle de blessure/guérison chronique expliquant en partie pourquoi certains individus atopiques développent l'asthme ou non (SUMI et HAMID, 2007). La récente observation qu'un polymorphisme du gène filaggrin (impliqué dans le maintien de l'intégrité épithéliale des voies respiratoires et de la peau) est associé avec l'asthme et la dermatite atopique ouvre la possibilité que l'origine de l'asthme n'est effectivement pas seulement immunologique (PALMER *et al.*,

2006, YING *et al.*, 2006). D'autres gènes nouvellement associés à l'asthme comme S100 ou ADAM-33 sont aussi intéressants à ce point de vue (HOLGATE, 2008, VAN EERDEWEGH *et al.*, 2002). L'importance de l'«epithelial mesenchymal trophic unit» par rapport à l'inflammation de type Th2 dans la pathogenèse de l'asthme a dernièrement été mise en évidence avec trois études utilisant des corticostéroïdes en inhalation. Dans chacune d'elles, l'administration de corticostéroïdes par inhalation chez de jeunes enfants nés de parents asthmatiques ou atopiques (à haut risque de souffrir d'asthme) avant le développement de l'asthme n'a pas influencé l'histoire naturelle de la maladie (BISGAARD *et al.*, 2006, GUILBERT *et al.*, 2006, MURRAY *et al.*, 2006). Effectivement, si l'inflammation de type Th2 (diminuée par les corticostéroïdes) était la seule responsable du développement et de la perpétuation de l'asthme, l'administration de corticostéroïdes aurait dû avoir un impact sur l'histoire naturelle de cette maladie, mais ce ne fut pas le cas (HOLGATE, 2008).

## **1.5 Le remodelage des voies respiratoires**

### **1.5.1 Définition**



**Figure 1 : Remodelage des voies respiratoires dans l'asthme (POULIN, 2008). Le**

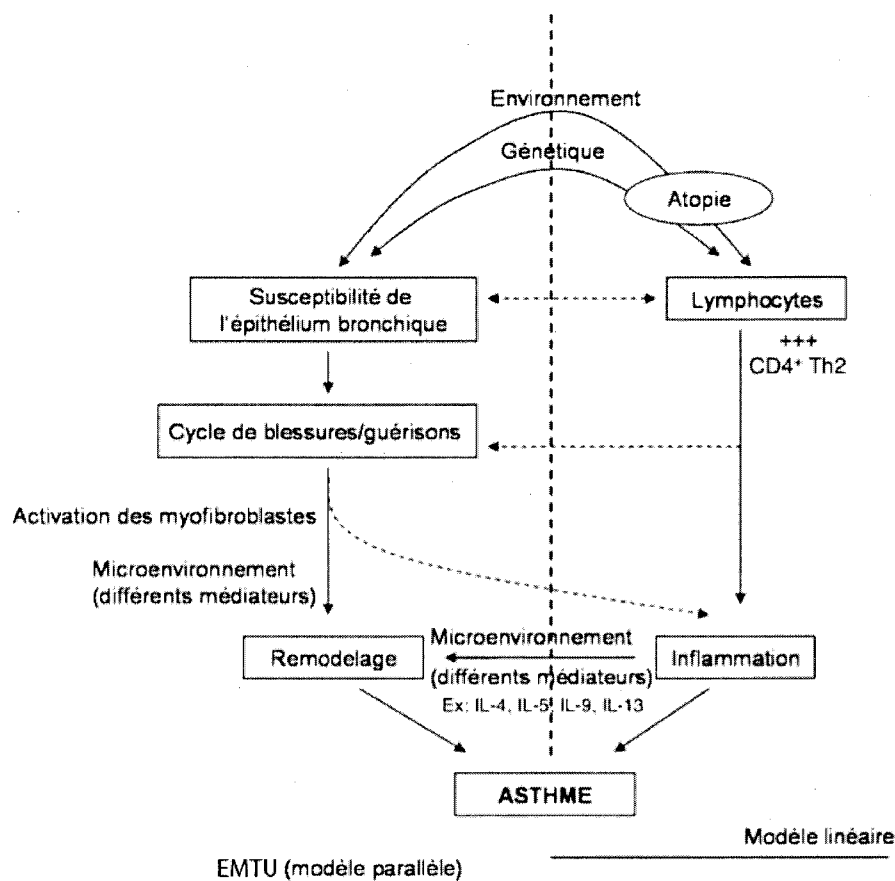
remodelage inclut plusieurs changements dans la composition, le contenu et l'organisation des constituants cellulaires et moléculaires des voies respiratoires. Les principaux sont représentés schématiquement ci-haut.

Dernièrement, un autre aspect de l'asthme attire beaucoup l'attention; le remodelage des voies respiratoires. Bien que difficilement définissable en une seule phrase, on peut le décrire comme étant des changements dans la composition, le contenu et l'organisation des constituants cellulaires et moléculaires des voies respiratoires centrales et périphériques (SUMI et HAMID, 2007). La littérature est très vaste lorsqu'il est question de décrire ces modifications, mais une chose est certaine, ils peuvent être présents à différents degrés et à différents moments dans l'évolution de la maladie (en accord avec l'hétérogénéité de l'asthme). Les changements les mieux décrits (voir Figure 1) et qui semblent les plus importants sont une dénudation de l'épithélium bronchique, une hyperplasie/métaplasie des cellules à mucus, un épaissement de la lamina réticularis (initialement décrit comme un épaissement de la «vraie» membrane basale incluant la lamina rara et la lamina densa), une fibrose sous-épithéliale, une hypertrophie/hyperplasie des cellules musculaires lisses et une augmentation de l'angiogenèse (HOMER et ELIAS, 2005). Plusieurs autres phénomènes peuvent aussi être présents comme une augmentation du nombre de myofibroblastes, une augmentation de la sécrétion d'un type précis de mucine (MUC5AC), une hypertrophie des glandes à mucus, des dysfonctions ciliaires, des modifications de la quantité, composition et distribution des molécules de la matrice extracellulaires (BOSSE *et al.*, 2008, PASCUAL et PETERS, 2005).

### 1.5.2 Pathophysiologie

Contrairement aux composantes immunologiques et inflammatoires de l'asthme, bien peu de choses sont connues par rapport aux changements cellulaires et moléculaires sous-jacents aux modifications structurales du remodelage des voies respiratoires. Pour l'instant, son existence est

expliquée par deux théories; l'inflammation chronique (modèle linéaire) et l'«epithelial mesenchymal trophic unit (EMTU)» (modèle parallèle) (voir Figure 2) (DAVIES *et al.*, 2003).



**Figure 2 : Pathophysiologie du remodelage des voies respiratoires dans l'asthme** (POULIN, 2008). Actuellement, deux théories sont avancées pour expliquer le remodelage ; le modèle linéaire et le modèle parallèle. EMTU ; epithelial mesenchymal trophic unit.

#### 1.5.2.1 Le modèle linéaire

Le modèle linéaire est le plus répandu et le mieux connu. Il implique l'interaction entre les cellules inflammatoires et les cellules structurales des voies respiratoires lors de la chronicisation de l'inflammation dans l'asthme ainsi que le relâchement de plusieurs médiateurs par ces cellules comme des cytokines, des chimiokines, des médiateurs lipidiques, des métalloprotéases, des inhibiteurs des métalloprotéases et des facteurs de croissance

(BERGERON et BOULET, 2006). C'est donc un microenvironnement dérivant de l'inflammation chronique qui serait responsable du remodelage, d'où le terme «linéaire» puisque le remodelage ne pourrait pas se produire sans d'abord la présence de l'inflammation. Selon leurs cellules cibles, les médiateurs relâchés auront différents rôles dans le remodelage comme la prolifération, la différenciation, la migration, l'activation et l'augmentation de la sécrétion de différents produits (ex : molécules de la matrice extracellulaire ou autres médiateurs) (DOHERTY et BROIDE, 2007).

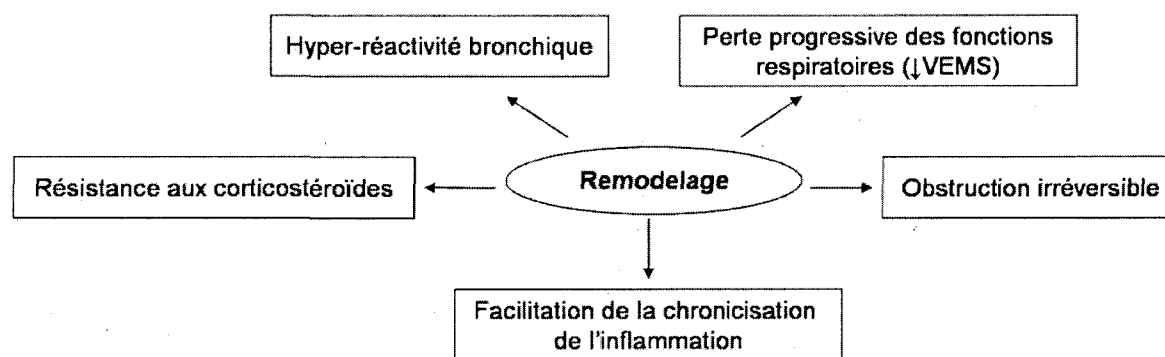
#### 1.5.2.2 Le modèle parallèle

Même si la théorie de l'inflammation chronique (modèle linéaire) semble être intéressante, elle ne permet pas d'expliquer pourquoi certains patients asthmatiques développent le remodelage tôt dans l'évolution de leur maladie (probablement avant la chronicisation de l'inflammation), ou encore pourquoi le traitement aux glucocorticoïdes ne parvient pas toujours à stopper ou prévenir son évolution (KNIGHT *et al.*, 2004). En effet, si le modèle linéaire était exact, le remodelage ne pourrait pas se former sans inflammation chronique et il serait inévitablement prévenu en utilisant de puissants anti-inflammatoires. Ainsi, l'hypothèse de l'«epithelial mesenchymal trophic unit» (modèle parallèle) a été soumise (HOLGATE *et al.*, 2000). L'EMTU ne réfute pas complètement le modèle linéaire, mais l'insère plutôt dans un modèle plus large. Il y aurait donc deux voies pouvant interagir ensemble à différents niveaux et fonctionnant en parallèle; d'un côté un défaut de susceptibilité de l'épithélium créant ultimement un microenvironnement adéquat pour le remodelage et facilitant l'inflammation, et de l'autre côté, l'inflammation chronique de type Th2 pouvant possiblement créer un microenvironnement pour le remodelage (SUMI et HAMID, 2007). Bref, c'est en offrant une voie alternative à l'inflammation chronique pour le processus du remodelage que l'EMTU expliquerait pourquoi certains patients développent le remodelage très tôt dans l'évolution de l'asthme ou que les



médicaments anti-inflammatoires ne préviennent pas toujours son évolution.

### 1.5.3 Conséquences



**Figure 3 : Conséquences du remodelage des voies respiratoires dans l'asthme (POULIN, 2008)**

L'asthme est souvent considéré comme une maladie pulmonaire obstructive réversible bénigne. Malheureusement, cette description n'est pas entièrement vraie et est trop simpliste. En effet, certains individus souffrant d'asthme chronique sévère peuvent développer différents degrés d'obstruction irréversible, une perte progressive et plus rapide que la normale des fonctions respiratoires (selon la mesure du VEMS) et une résistance au traitement par corticostéroïdes (TEN HACKEN *et al.*, 2003). En fait, les patients résistants aux corticostéroïdes ont probablement un phénotype avec prédominance de remodelage, tandis que les patients susceptibles aux corticostéroïdes ont probablement un phénotype avec prédominance d'inflammation (HOLGATE *et al.*, 2006). Bien qu'il n'y ait pas encore de preuves irréfutables, le remodelage des voies respiratoires a été montré comme ayant un rôle potentiel à jouer dans les points cités plus hauts. Finalement, il aurait aussi comme conséquence d'augmenter l'hyper-réactivité bronchique et d'agir comme facilitateur de l'installation de l'inflammation chronique (SUMI et HAMID, 2007) (voir Figure 3). Pour l'instant, il n'est pas encore bien connu si, et comment, chaque composante (seule ou en combinaison) du remodelage a des conséquences sur

l'asthme.

#### 1.5.3.1 Rôles de l'angiogenèse

L'augmentation de la vascularité est une constituante reconnue du remodelage des voies respiratoires dans l'asthme (WALTERS *et al.*, 2008). Reconnue comme une caractéristique des voies respiratoires enflammées dès 1960 (DUNNILL, 1960), c'est en 1997 qu'une première étude nota plus précisément une augmentation du nombre de vaisseaux sanguins de la lamina propria des poumons de patients asthmatiques par biopsie bronchique (LI et WILSON, 1997). Depuis ce temps, de nombreuses études ont appuyé cette observation et ont suggéré que les conséquences fonctionnelles de cette hyper-vascularité (faisant partie du remodelage des voies respiratoires) étaient l'augmentation de l'obstruction bronchique, l'augmentation de l'hyper-réactivité bronchique et l'amplification de la réponse inflammatoire (CHETTA *et al.*, 2005, CHETTA *et al.*, 2007, WALTERS *et al.*, 2008, WILSON et HII, 2006). L'hyper-vascularité serait également essentielle pour assurer une oxygénation et un apport en nutriment adéquat pour certaines composantes du remodelage des voies respiratoires (BOSSE *et al.*, 2008). Par exemple, l'hyperplasie/hypertrophie des cellules musculaires lisses nécessite une augmentation du support sanguin pour son maintien. En plus du nombre de vaisseaux sanguins, il y a aussi une augmentation de leur grosseur et une augmentation de la perméabilité vasculaire (WALTERS *et al.*, 2008). Dans le remodelage des voies respiratoires de l'asthme, il y aurait un déséquilibre vers le côté pro-angiogénique à cause de l'inflammation chronique (cellules et médiateurs impliqués) et/ou de l'EMTU (HOLGATE, 2008) ou indirectement via la force mécanique imposée aux cellules musculaires lisses (HASANEEN *et al.*, 2007).

#### 1.5.4 Traitements

Les médicaments d'aujourd'hui et leur mode d'utilisation ne sont pas toujours efficaces pour prévenir le remodelage des voies respiratoires, et encore moins pour le traiter (réversibilité)

(POHUNEK, 2006, RICCIONI *et al.*, 2004, SZEFLER, 2005). L'efficacité des corticostéroïdes est encore controversée pour plusieurs composantes du remodelage, montrant parfois des capacités de prévention/réversibilité, parfois aucun effet, ou encore des aggravations (MAUAD *et al.*, 2007). Par exemple, le stéroïde triamcinolone acétonide est capable de réduire la prolifération des fibroblastes *in vitro* (ODDERA *et al.*, 2002), tandis que la dexaméthasone peut augmenter la prolifération des fibroblastes de patients asthmatiques (FOUTY *et al.*, 2006, KRAFT *et al.*, 2001). Certaines études *in vitro* ont montré que la dexaméthasone arrêtaient les cellules musculaires lisses dans la phase G1 du cycle cellulaire et inhibait quelques effets prolifératifs de certains facteurs de croissances (FERNANDES *et al.*, 1999). D'un autre côté, des corticostéroïdes ont montré un effet d'augmentation de synthèse de CTGF, collagène I et fibronectine de la part des cellules musculaires lisses en culture (JOHNSON *et al.*, 2000). Selon la gravité de l'asthme, un certain nombre de patients développe donc inévitablement du remodelage, avec ou sans les conséquences possibles, même avec un traitement optimal (HOLGATE, 2008, MAUAD *et al.*, 2007). La question à savoir quelle composante du remodelage devons-nous cibler pour chaque changement clinique observé devra aussi être étudié plus en profondeur.

## **Partie 2 : LES CYSTEINYL-LEUCOTRIÈNES (cysLTs)**

### **2.1 Historique**

L'histoire des cysteinyl-leucotriènes (cysLTs) a commencé dès 1938 lorsqu'un groupe de l'Australie a suggéré l'existence d'une nouvelle substance libérée dans l'effluent des poumons perfusés de cochon d'inde exposé à du venin de serpent (FELDBERG et KELLAWAY, 1938). Puisque l'effluent des poumons induisait une contraction de l'intestin du cochon d'inde plus prolongée que celle induite par l'histamine uniquement, ils nommèrent ce composé «slow-reacting smooth muscle-stimulating substance (SRS)» en supposant que ses effets étaient différents

de ceux de l'histamine. Ensuite, c'est au début des années 1960 qu'un groupe de l'Angleterre identifia une substance libérée par la réaction antigène-anticorps au niveau des poumons et qui causait une contraction lente et persistante de l'iléon de cochon d'inde d'une façon indépendante de l'histamine (résistante aux antihistaminiques nouvellement disponibles à ce moment) (AUSTEN et BROCKLEHURST, 1961). Ils baptisèrent cette substance «slow-reacting substance of anaphylaxis (SRS-A)» avant qu'il ne soit plus tard évident que SRS et SRS-A étaient les mêmes molécules. Ce n'est par contre qu'en 1979-1980 que la caractérisation de la structure de SRS-A fut décrite. En fait, leurs travaux réussirent à déterminer que SRS-A est un mélange de trois molécules lipidiques qui sont des métabolites de l'acide arachidonique contenant trois doubles liens conjugués et un peptide contenant la cystéine; les cysteinyl-leucotriènes LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> et LTE<sub>4</sub> («Leuco-» pour globule blanc et «-triènes» pour 3 doubles liens conjugués) (MORRIS *et al.*, 1980, SAMUELSSON *et al.*, 1979). En 1982, une propriété cruciale des cysLTs fut identifiée; une capacité de bronchoconstriction 1000x supérieure à l'histamine (WEISS *et al.*, 1982). En 1984, les premières évidences de la présence de différents récepteurs pour les cysLTs commencèrent à faire leur apparition dû au fait que leur potentiel de contraction du parenchyme pulmonaire était très différent (LEE *et al.*, 1984). Près de deux décennies plus tard, les deux premiers récepteurs ont été clonés (CysLT1 et CysLT2) (HEISE *et al.*, 2000, LYNCH *et al.*, 1999). Aujourd'hui, les cysLTs ont été démontrés comme jouant un rôle important aussi bien dans des situations physiologiques de défense de l'hôte dans l'immunité innée que dans des situations pathologiques comme l'asthme, la rhinite allergique, l'athérosclérose, des tumeurs et bien d'autres maladies (PETERS-GOLDEN et HENDERSON, 2007).

## **2.2 Synthèse**

### **2.2.1 Profil d'expression**

Les cysLTs sont principalement synthétisés par les leucocytes comme les éosinophiles (+++cysLTs), les mastocytes (cysLTs>LTB<sub>4</sub>), les basophiles (+++cysLTs), les monocytes/macrophages (LTB<sub>4</sub>≥cysLTs) et les cellules dendritiques (LTB<sub>4</sub>>cysLTs). Les neutrophiles et les lymphocytes B expriment presque uniquement le LTB<sub>4</sub> (un leucotriène ne faisant pas partie de la classe de cysteinyl-leucotriènes) tandis que les lymphocytes T ne semblent pas être une source significative de leucotriènes (PETERS-GOLDEN et HENDERSON, 2007). Une fois synthétisés, les cysLTs agissent localement d'une façon autocrine ou paracrine (FLAMAND *et al.*, 2007). Fait intéressant, les cellules précurseurs circulantes de fibroblastes ou myofibroblastes, les fibrocytes, ainsi que les fibroblastes bronchiques peuvent aussi produire des cysLTs (JAMES *et al.*, 2006, VANNELLA *et al.*, 2007).

### 2.2.2 Biosynthèse classique

Les cysteinyl-leucotriènes sont des membres d'une grande famille de molécules nommées «eicosanoïdes». Ce mot provient du terme grecque «eikosi» signifiant «20» étant donné que les eicosanoïdes sont des lipides biologiquement actifs dérivés de la conversion enzymatique d'acides gras polyinsaturés contenant 20 carbones (SOBERMAN et CHRISTMAS, 2003). Le précurseur principal des eicosanoïdes chez l'homme est l'acide gras arachidonique (20:4, 6). L'acide arachidonique est normalement retrouvée en position sn-2 des phospholipides membranaires et doit donc être relâché par l'action d'une phospholipase pour le début de la synthèse des eicosanoïdes (DIAZ et ARM, 2003). Une fois l'acide arachidonique libre, elle peut être métabolisée par 3 voies enzymatiques majeures : l'enzyme cyclooxygénase, produisant les prostaglandines et les thromboxanes, l'enzyme lipoxygénase, produisant les leucotriènes et les lipoxines, et la voie du cytochrome p450 qui mène aux produits des epoxygenases et des  $\omega$ -hydroxylases (SOBERMAN et CHRISTMAS, 2003). Pour ce qui est de



(PETERS-GOLDEN et BROCK, 2001). Une fois l'acide arachidonique (AA) libérée des phospholipides membranaires, particulièrement ceux de la membrane périnucléaire, l'AA lie l'enzyme «5-lipoxygenase activating protein (FLAP)» présente dans la membrane périnucléaire. En fait, FLAP est essentielle à l'interaction entre le substrat (AA) et son enzyme 5-lipoxygénase (5-LO). L'action de 5-LO, qui transloque du nucléoplasme ou du cytoplasme d'une façon calcium-dépendante vers la membrane périnucléaire interne ou externe une fois activée par divers stimuli, est de catalyser deux réactions une à la suite de l'autre: la conversion de AA en 5-hydroperoxyeicosatetraenoic acid (5-HPETE) par l'insertion de l'oxygène (O<sub>2</sub>) et la conversion de 5-HPETE en LTA<sub>4</sub> par déshydratation. L'intermédiaire 5-HPETE est très instable et peut aussi être rapidement modifié en 5-hydroxyeicosatetraenoic acid (5-HETE) par les peroxydases. 5-HETE peut ensuite être métabolisé en 5-oxo-eicosatetraenoic acid (5-oxo-ETE) par l'enzyme 5-hydroxyeicosanoid dehydrogenase (5-HEDH). L'étape de la synthèse de LTA<sub>4</sub>, qui a une très courte demi-vie, est le point de convergence des deux classes de leucotriènes : LTB<sub>4</sub> et les cysLTs (KANAOKA et BOYCE, 2004, PETERS-GOLDEN et BROCK, 2001).

La synthèse de LTB<sub>4</sub> requiert l'enzyme LTA<sub>4</sub> hydrolase (LTA<sub>4</sub>H), tandis que la synthèse des cysLTs nécessite la conjugaison de LTA<sub>4</sub> avec le glutathionne réduit (GSH) pour d'abord former le LTC<sub>4</sub> via l'enzyme microsomale LTC<sub>4</sub> synthase (LTC<sub>4</sub>S) ou possiblement via d'autres enzymes microsomaux comme mGST2 et mGST3. L'enzyme LTC<sub>4</sub>S, tout comme FLAP (et PLA2 et 5-LO après leur translocation), est située dans la membrane périnucléaire mais plus précisément sur la membrane externe seulement. Une fois LTC<sub>4</sub> formé, il peut être exporté dans le milieu extracellulaire d'une façon énergie-dépendante par le transporteur MRP-1 (multi resistance protein 1) pour ensuite former LTD<sub>4</sub> via le clivage du résidu acide glutamique du GSH avec l'aide des enzymes  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GT) ou  $\gamma$ -glutamyl leucotriénase ( $\gamma$ -GL). LTD<sub>4</sub> peut finalement être changé en LTE<sub>4</sub> via l'enzyme dipeptidase qui clive le résidu glycine du GSH. Bref, la synthèse des cysLTs est particulière étant donné qu'ils sont produits

rapidement via leur substrat membranaire (AA) par rapport à d'autres médiateurs préformés et entreposés dans des granules (ex: histamine) ou d'autres nécessitant la transcription et la traduction de leur ARNm après stimulus (ex : cytokines) (KANAOKA et BOYCE, 2004, PETERS-GOLDEN et BROCK, 2001, SOBERMAN et CHRISTMAS, 2003). La synthèse des leucotriènes est une question de secondes ou de minutes (PETERS-GOLDEN *et al.*, 2005).

### 2.2.3 Biosynthèse transcellulaire

La synthèse des leucotriènes peut quand même avoir lieu chez des cellules n'ayant pas toute la machinerie enzymatique nécessaire. Par exemple, les plaquettes et les cellules endothéliales n'expriment pas suffisant d'enzyme 5-LO et de protéine FLAP nécessaire à la formation de LTA<sub>4</sub>. Cependant, puisqu'elles ont la machinerie enzymatique pour changer LTA<sub>4</sub> en LTC<sub>4</sub> via la LTC<sub>4</sub>S (ou d'autres comme mGST2), il a été démontré qu'elles peuvent capter le LTA<sub>4</sub> provenant d'une autre source cellulaire comme par exemples les neutrophiles pour ensuite le changer en cysLTs. Les neutrophiles expriment la 5-LO et FLAP mais n'ont pas suffisamment de LTC<sub>4</sub>S pour produire du LTC<sub>4</sub>. Ainsi, ce procédé peut aider à expliquer les fortes concentration de cysLTs parfois rencontrées dans un environnement donné (CAPRA *et al.*, 2007, PETERS-GOLDEN et HENDERSON, 2007).

### 2.2.4 Catabolisme

La perte d'activité biologique des cysLTs est d'abord reliée à la conversion de LTC<sub>4</sub> et LTD<sub>4</sub> en LTE<sub>4</sub>, un médiateur avec moins beaucoup moins d'affinité pour les récepteurs et retrouvé dans les urines. Aussi, trois voies peuvent co-exister. La première est la conversion de LTE<sub>4</sub> en dérivés N-acétylés qui sont aussi retrouvés dans l'urine. La deuxième est la réaction des cysLTs avec l'acide hypochlorique pour former des sulfoxides et LTB<sub>4</sub>. Enfin, les cysLTs peuvent être tronqués via la  $\omega$ -oxydation et  $\beta$ -élimination. *In vivo*, les cysLTs ont une demi-vie en terme de secondes ou minutes (CAPRA *et al.*, 2007).



## **2.3 Récepteurs**

Originellement identifiés selon leur sensibilité variable aux antagonistes «classiques» comme Montelukast, Zafirlukast, Pranlukast, Pobilukast et MK571, ce n'est que lorsque leur clonage a été réussi chez l'humain (1999, 2000) que ces données pharmacologiques ont pu être confirmées (LYNCH *et al.*, 1999, NOTHACKER *et al.*, 2000, SARAU *et al.*, 1999, TAKASAKI *et al.*, 2000). Les actions biologiques des cysteinyl-leucotriènes sont donc produites via des interactions avec ces récepteurs membranaires couplés aux protéines G (GPCR) de la famille de la rhodopsine dans le cluster des récepteurs purinergiques (groupe), c'est-à-dire les récepteurs des cysteinyl-leucotriènes (CysLTRs) : CysLT1, sensible aux antagonistes «classiques», et CysLT2, insensible. Le groupe à lequel appartient les CysLTRs contient entre autre des récepteurs orphelins, les récepteurs purinergiques/pyrimidinergiques P2Ys, les récepteurs F2Rs et le récepteur PAFR. Les CysLTRs (voir Tableau 1) sont des récepteurs composés de 7 domaines transmembranaires, 3 boucles intracellulaires, 3 boucles extracellulaires, une queue N-terminale extracellulaire et une queue C-terminale intracellulaire (CAPRA, 2004, CAPRA *et al.*, 2007).

**Tableau 1 : Principales différences entre les récepteurs CysLT1 et CysLT2**

	<b>CysLT1</b>	<b>CysLT2</b>
<i>Localisation</i>	Xq13-Xq21	13q14.12-q21.1
<i>Structure génomique</i>	5 exons, 4 introns (≥ 4 variants)	6 exons, 5 introns (≥ 8 variants)
<i># Acides aminées</i>	337	346
<i>Poids moléculaire</i>	38 kDa	58 kDa
<i>Affinités</i>	LTD4>LTC4>>LTE4	LTD4=LTC4>>LTE4
<i>Antagonistes spécifiques</i>	Montelukast, Zafirlukast, Pranlukast...	-
<i>Antagoniste non-spécifique</i>	Bay u9773	Bay u9773

### 2.3.1 Cysteinyl leukotriene receptor 1 (CysLT1)

Chez l'humain, le gène de CysLT1 est situé sur le chromosome X (Xq13-Xq21), contient 4 introns et 5 exons variablement épissés et un promoteur sans boîte TATA avec plusieurs sites d'initiation de la transcription. La protéine est composée de 337 acides aminés et a un poids moléculaire calculé de 38 kD (poids moléculaire de migration entre 30 et 42kD en monomère). Jusqu'à maintenant, 4 transcrits différents ont été identifiés mais leurs rôles biologiques sont encore mal compris. Fait intéressant, la région codante se retrouve uniquement dans l'exon 5 et n'est pas interrompue par un intron (CAPRA *et al.*, 2007, WOSZCZEK *et al.*, 2005). Chez les cellules exprimant CysLT1, l'ordre l'affinité et de puissance de ses agonistes est LTD<sub>4</sub> > LTC<sub>4</sub> >> LTE<sub>4</sub>. Plus précisément, chez des cellules HEK-293T exprimant le récepteur CysLT1 par transfection, les EC<sub>50</sub> de l'activation du flux calcique ont été calculé comme suit : 2,5 nM pour LTD<sub>4</sub>, 24nM pour LTC<sub>4</sub> et 240 nM pour LTE<sub>4</sub>. Les antagonistes spécifiques à CysLT1 sont les antagonistes «classiques» nommés ci-haut (BACK, 2002, CAPRA *et al.*, 2007). Pour ce qui est de l'expression de CysLT1 (un bref aperçu), il a été montré comme étant fortement exprimé dans la rate et les leucocytes périphériques sanguins et moyennement exprimé dans les poumons, le petit intestin, la veine saphène et le placenta. Au niveau du foie, du colon, des reins, des muscles squelettiques, du thymus, des ovaires, des testicules, du cœur et du cerveau (sauf en cas de trauma ou tumeur), son expression était soit faible ou absente (EVANS, 2002, KANAOKA et BOYCE, 2004). Plus spécifiquement au niveau des poumons, CysLT1 a été observé chez les cellules musculaires lisses bronchiques, les macrophages interstiels, les fibroblastes bronchiques et faiblement sur les cellules épithéliales. D'autres cellules pouvant résider dans les poumons comme les mastocytes et plasmocytes expriment aussi CysLT1 (CAPRA, 2004, HUI et FUNK, 2002). Au niveau des leucocytes périphériques sanguins (certaines pouvant infiltrer les poumons en cas d'inflammation), CysLT1 a été observé chez les monocytes/macrophages, les éosinophiles, les lymphocytes B, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, les cellules dendritiques, les cellules prégranulocytiques CD34<sup>+</sup>, les basophiles et les neutrophiles (EVANS, 2002, KANAOKA et

BOYCE, 2004). Enfin, CysLT1 contient 4 sites potentiels de N-glycosylations (un dans la queue N-terminale, deux dans la 2<sup>e</sup> et un dans la 3<sup>e</sup> boucle extracellulaire) et plusieurs sites de phosphorylation par PKA et PKC (dans la 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire et dans la queue C-terminale) (CAPRA *et al.*, 2007).

### 2.3.2 Cysteinyl leukotriene receptor 2 (CysLT2)

Chez l'humain, le gène de CysLT2 est situé sur le chromosome 13 (13q14.12-q21.1) près d'un marqueur qui a été associé à l'asthme allergique, contient 5 introns et 6 exons variablement épissés et un promoteur sans boîte TATA avec plusieurs site d'initiation de la transcription. Pour ce qui est de sa protéine, elle est composée de 346 acides aminés avec un poids moléculaire de 58 kD en migration. Jusqu'à maintenant, 8 différents transcrits ont été identifiés mais tout comme CysLT1, leurs rôles biologiques sont encore mal compris (CAPRA *et al.*, 2007, WOSZCZEK *et al.*, 2007). L'homologie entre CysLT1 et CysLT2 est seulement de 38% avec une très faible homologie dans la région C-terminale. Chez les cellules exprimant CysLT2, l'ordre d'affinité et de puissance de ses agonistes est LTD<sub>4</sub>=LTC<sub>4</sub>>>LTE<sub>4</sub> (CAPRA, 2004). Plus précisément, chez les cellules HEK-293T exprimant le récepteur CysLT2 par transfection, les EC50 de l'activation du flux calcique ont été calculé comme suit : 4,4 nM pour le LTD<sub>4</sub>, 8,9 nM pour le LTC<sub>4</sub> et 293 nM pour le LTE<sub>4</sub>. Contrairement à CysLT1, aucun antagoniste spécifique n'est connu pour l'instant mais il existe un antagoniste non spécifique pour CysLT1 et CysLT2 nommé BAYu9773 (CAPRA *et al.*, 2007). Au niveau de son expression (un bref aperçu), elle semble être à la fois redondante et distinctive par rapport à CysLT1. En effet, contrairement à CysLT1, CysLT2 est exprimé au niveau du cœur, du cerveau, des glandes surrénales et est exprimé à la surface des cellules HUVECs. Cependant, tout comme CysLT1, CysLT2 est présent dans les leucocytes périphériques sanguins, la rate, la veine saphène, le placenta, le petit intestin etc... (EVANS, 2002, KANAOKA et BOYCE, 2004). Plus précisément au niveau des poumons,

CysLT2 est fortement exprimé par les macrophages interstiels et faiblement par les cellules musculaires lisses bronchiques. De plus, les cellules épithéliales A549 dérivant d'un adénocarcinome pulmonaire expriment seulement CysLT2. Tout comme CysLT1, CysLT2 est aussi présent sur les mastocytes (CAPRA, 2004, CAPRA *et al.*, 2007, HUI et FUNK, 2002). Au niveau des leucocytes périphériques sanguins, CysLT2 est présent sensiblement sur les mêmes cellules que CysLT1 mais notons que son expression est très élevée sur les éosinophiles. Contrairement à CysLT1, CysLT2 n'est pas présent sur les lignées cellulaires non différenciées ou différenciées HL-60 et U937 (EVANS, 2002, KANAOKA et BOYCE, 2004). Enfin, tout comme CysLT1, CysLT2 possède 4 sites de potentiels de N-glycosylation (trois dans la queue N-terminale et un dans la 2<sup>e</sup> boucle extracellulaire) et plusieurs sites de phosphorylation par PKA et PKC (dans la 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire et dans la queue C-terminale) (CAPRA *et al.*, 2007).

### 2.3.3 GPR17

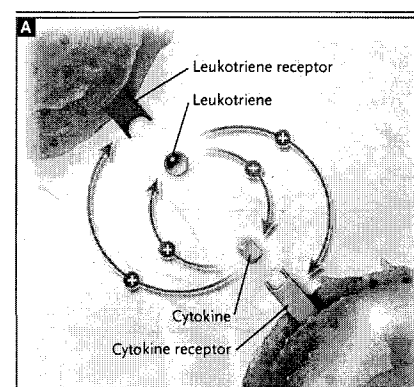
Nouvellement identifié comme un récepteur dualistique entre les cysteinyl-leucotriènes et le système purinergique, l'ancien récepteur orphelin GPR17 est situé sur le chromosome 2 (2q21), fait 339 acides aminés et un poids moléculaire de 38kD. L'ordre de puissance des ligands chez les cellules 1321N1 transfectées avec GPR17 pour l'activation du flux calcique et l'inhibition de l'adénylyl cyclase (GPR17 est couplé à G<sub>i</sub>) est LTC<sub>4</sub> > LTD<sub>4</sub> >> LTE<sub>4</sub> et UDP=UDP-galactose > UDP-glucose respectivement. De plus, les antagonistes de CysLT1 Montelukast et Pranlukast peuvent empêcher l'activation de GPR17 autant par les cysLTs que par les UDP. L'expression de GPR17 a été montrée à des endroits pouvant facilement subir des dommages ischémiques comme le cerveau, les reins et le cœur. Il a aussi été observé chez les cellules HUVECs et MCF7, faiblement dans le foie et les poumons, mais pas chez les cellules mononucléaires périphériques sanguines, les cellules musculaires lisses, U-937, HeLa et bien

d'autres. Pour l'instant, ses fonctions sont mal connues mais il semblerait être impliqué dans l'inflammation et les dommages ischémiques (CIANA *et al.*, 2006, LECCA *et al.*, 2008).

#### 2.3.4 Autres

En plus de CysLT1, CysLT2 et GPR17, quelques observations dans la littérature laissent croire qu'il pourrait bien y avoir un (ou des) récepteur(s) supplémentaire(s). Par exemple, la contraction induite par LTC<sub>4</sub> dans les artères pulmonaires humaine est résistante à la fois aux antagonistes MK571 (CysLT1) et au BAYu9773 (CysLT1 et CysLT2) (BACK *et al.*, 2000, WALCH *et al.*, 2002). De plus, des essais de liaison sur le parenchyme pulmonaire humain ont montré que LTC<sub>4</sub> semble avoir un site de liaison distinct de celui de LTD<sub>4</sub> (CAPRA *et al.*, 1998) et chez les éosinophiles, la relâche de IL-4 par LTC<sub>4</sub> est 10x supérieure à celle induite par LTD<sub>4</sub> et n'est pas inhibé par MK571 ou BAYu9773 (BANDEIRA-MELO *et al.*, 2002). Enfin, toujours dans l'étude chez les éosinophiles, les ligands UDP ou UTP ne semble pas avoir d'effet sur ce «nouveau» récepteur. Il sera donc important dans le futur de déterminer si oui ou non d'autres récepteurs existent ou encore si ces observations sont le résultat de dimérisation des CysLTRs (voir plus loin).

#### 2.3.5 Immunomodulation



**Figure 5 : Interactions entre les leucotriènes et cytokines (immunomodulation) (PETERS-GOLDEN et HENDERSON, 2007)**

Il est maintenant bien connu qu'il existe des interactions complexes entre le système leucotriènes/CysLTRs et les cytokines (voir Figure 5). En fait, les leucotriènes peuvent induire la synthèse et la relâche de plusieurs cytokines chez plusieurs types cellulaires et inversement, les cytokines peuvent aussi affecter la réponse cellulaire face aux leucotriènes en modulant l'expression des CysLTRs chez divers types cellulaires (ROLA-PLESZCZYNSKI et STANKOVA, 2007). Notons par exemple l'induction de IL-8 par LTD<sub>4</sub> chez les cellules dendritiques via CysLT1 (THOMPSON *et al.*, 2006) et par LTC<sub>4</sub>/CysLT2 chez les cellules HUVECs (THOMPSON *et al.*, 2008). En accord avec l'importance de l'inflammation de type Th2 dans certaines pathologies impliquant les cys-leucotriènes (ex: asthme), les CysLTRs sont la plupart du temps modulés à la hausse par des cytokines de type Th2 au lieu du type Th1 (ROLA-PLESZCZYNSKI et STANKOVA, 2007). Notons par exemple l'augmentation de l'expression de CysLT1 chez des fibroblastes bronchiques par IL-13 (CHIBANA *et al.*, 2003), chez les éosinophiles par IL-5 (THIVIERGE *et al.*, 2000) et chez des monocytes/macrophages par IL-4 et IL-13 (THIVIERGE *et al.*, 2001). De plus, IL-4 est capable d'augmenter l'expression de CysLT2 chez les mastocytes (EARLY *et al.*, 2007). Cependant, certaines exceptions existent comme par exemple l'augmentation de l'expression de CysLT2 par INF $\gamma$  chez les cellules endothéliales (WOSZCZEK *et al.*, 2007) et les éosinophiles (FUJII *et al.*, 2005). Bref, la réponse cellulaire face aux cysLTs est dépendante de l'environnement local et est sujette à une fine régulation.

#### 2.3.6 Localisation périnucléaire

Initialement décrit comme localisé uniquement au niveau de la membrane plasmatique, les CysLTRs pourraient bien être également localisé sur la membrane périnucléaire comme certains autres GPCRs (ex :EP<sub>3</sub>) (BHATTACHARYA *et al.*, 1999). Par exemple, CysLT1 (NIELSEN *et al.*, 2005) et CysLT2 (MAGNUSSON *et al.*, 2007) ont été localisé sur la membrane

périnucléaire des cellules de cancer colorectal et CysLT1 est capable d'être transloqué de la membrane plasmique au noyau par une exposition prolongée à LTD<sub>4</sub> chez des cellules épithéliales intestinales non cancéreuses. D'ailleurs, une séquence NLS de la queue C-terminale de CysLT1 est essentielle à sa translocation au noyau (NIELSEN *et al.*, 2005). De plus, CysLT1 et CysLT2 ont été observés sur la membrane périnucléaire d'une lignée de mastocytes humaines (LAD2) (JIANG *et al.*, 2007). Évidemment, il sera important dans le futur de déterminer les fonctions, différentes ou non, de ces récepteurs nucléaires par rapport à ceux localisés à la membrane plasmique.

#### 2.3.7 Formation d'homo- ou hétérodimères

Plusieurs GPCR sont maintenant reconnus comme étant capable de faire des homo- ou hétérodimères (MILLIGAN *et al.*, 2003). Quelques évidences dans la littérature laissent déjà entrevoir cette possibilité pour les CysLTRs comme par exemple l'observation de dimères et d'oligomères de CysLT1 en western blot chez les cellules PBLs ou U937 (FIGUEROA *et al.*, 2001) et l'observation d'hétérodimères CysLT1/CysLT2 sur la membrane périnucléaire des cellules LAD2 (JIANG *et al.*, 2007). Il sera intéressant dans le futur de déterminer si les CysLTRs ont réellement cette capacité et si oui, déterminer l'impact biologique et pharmacologique.

### 2.4 Transduction du signal

La transduction du signal des CysLTRs est très complexe et il est impossible de tirer des conclusions définitives. Cette complexité vient d'abord du fait que le type de protéines G couplées aux récepteurs CysLT1 et CysLT2 est variable selon le type cellulaire et si nous sommes en présence d'un système recombinant (cellules transfectées avec un CysLT1 ou CysLT2) ou natif (lignée cellulaire ou cellule primaire). En effet, dans les systèmes

recombinants, il semblerait que CysLT1 et CysLT2 sont presque toujours couplés à  $G\alpha_{q/11}$  tandis que dans les systèmes natifs ils peuvent être couplés à  $G\alpha_{q/11}$  et/ou  $G\alpha_{i/o}$  (ROVATI et CAPRA, 2007). Par exemple, la relâche de calcium intracellulaire par LTD<sub>4</sub> chez les cellules HEK-293T exprimant le récepteur CysLT1 après transfection (système recombinant; HEKLT1) a été montrée comme étant PTX-insensible ce qui laisse croire que dans ce modèle CysLT1 n'est pas couplé à  $G\alpha_{i/o}$  mais bien à  $G\alpha_{q/11}$  (LYNCH *et al.*, 1999). Par contre, la relâche de calcium et la réponse chimiotactique des monocytes humains (système natif) via CysLT1 semble être dépendante de  $G\alpha_{i/o}$  (PTX-sensible) (WOSZCZEK *et al.*, 2008) tandis que chez la lignée monocyttaire U937 (système natif) la relâche de calcium intracellulaire par CysLT1 est à la fois reliée à  $G\alpha_{i/o}$  et  $G\alpha_{q/11}$  (CAPRA *et al.*, 2004). Pour ce qui est de CysLT2, l'activation du flux chlorique calcium-dépendant par LTC<sub>4</sub> chez des ovocytes de *Xenopus* transfectés avec CysLT2 (système recombinant) (HEISE *et al.*, 2000) tout comme l'activation du flux calcique chez les HUVECs est insensible à PTX (lié à  $G\alpha_{q/11}$  et non à  $G\alpha_{i/o}$ ) (ROVATI et CAPRA, 2007). D'un autre côté, la signalisation induite par CysLT2 chez les mastocytes humain (système natif) a été montré comme étant couplé avec  $G\alpha_{i/o}$  (MELLOR *et al.*, 2003). Pour ce qui est de GPR17, jusqu'à maintenant il a seulement été observé comme étant couplé avec  $G\alpha_{i/o}$  (CIANA *et al.*, 2006).

#### 2.4.1 via CysLT1

Les voies de signalisation induite par la liaison des cysLTs à CysLT1 peuvent impliquer différents seconds messagers et activer différents facteurs de transcription selon le contexte cellulaire. En général, CysLT1 a été montré comme étant capable (selon les différents contextes) d'activer la voie PLC/PIP<sub>2</sub>/DAG, InsP<sub>3</sub>/relâche de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, d'activer des petites protéines G comme Ras, Rac et RhoA, les MAPK, les PKCs et la PI3K. Les facteurs de transcription ayant été montrés comme activables par CysLT1 sont majoritairement AP-1,



NFKB, NF-IL6 (C/EBP) (CAPRA *et al.*, 2007, ROVATI et CAPRA, 2007) et tout récemment, les STATs (PROFITA *et al.*, 2008). Par exemple, l'activation du promoteur de IL-8 induit par LTD<sub>4</sub> chez les HEKLT1 a été montrée comme impliquant AP-1 et NFKB. Dans ce contexte, LTD<sub>4</sub> est capable d'augmenter la liaison de AP-1 (c-fos/c-jun) et NFKB (p50/p65) au promoteur de IL-8 via entre autre l'augmentation de la synthèse de c-fos et c-jun (ARNm) et la phosphorylation de c-jun pour AP-1, et la phosphorylation de IKBA et de p65 pour NFKB (THOMPSON *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'induction de l'expression de la furine par LTD<sub>4</sub> via CysLT1 chez les cellules THP-1 et Monomac-1 nécessite les MAPK Mek-1 (en amont de Erk), p38 et Jnk et l'activation de son promoteur nécessite partiellement AP-1 (c-fos/c-jun) chez les cellules HEKLT1 (THOMPSON *et al.*, 2008). De nombreux autres exemples existent, comme la migration des cellules épithéliales intestinales qui est PI3K et Rac dépendante (PARUCHURI *et al.*, 2005), l'activation de Erk1/2 chez les dU937 qui implique la voie PLC/InsP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup>/Ras (CAPRA *et al.*, 2004), l'activation de Erk1/2 chez les THP-1 qui implique la voie PKC/Raf-1 (HOSHINO *et al.*, 1998) et la prolifération des cellules mésangiales rénales qui nécessite l'activation de Erk et p38 d'une façon PKC et PI3K dépendante (MCMAHON *et al.*, 2000). Tout récemment, LTD<sub>4</sub> a été montré pour la première fois comme étant capable d'activer STAT1 chez des cellules épithéliales bronchiques exprimant CysLT1 d'une façon stable via sa phosphorylation par Erk1/2 activé préalablement par PKC (PROFITA *et al.*, 2008). De plus, des observations non publiées de notre laboratoire ont déjà montré que LTD<sub>4</sub> était capable d'augmenter la translocation au noyau de STAT3 chez des monocytes humains. Au meilleur de mes connaissances, aucune étude n'a encore démontré l'activation du facteur de transcription Sp1 par les CysLTRs.

#### 2.4.2 via CysLT2

Par rapport à CysLT1, les voies de signalisation et facteurs de transcription utilisés par CysLT2

sont beaucoup moins connus mais quelques données sont disponibles. Par exemple, l'activation du promoteur de IL-8 par LTC<sub>4</sub> dans des cellules HEK293 exprimant d'une façon stable CysLT2 (HEKLT2) a été montrée comme impliquant AP-1, NFκB et partiellement NF-IL-6 (C/EBP). Dans ce contexte, LTC<sub>4</sub> est capable d'augmenter la liaison de AP-1 (c-fos/c-jun) au promoteur de l'IL-8 via entre autre la phosphorylation de c-jun d'une façon PKCδ-dépendante et JNK-indépendante (même si JNK est activé). Pour NFκB, LTC<sub>4</sub> est capable d'induire la phosphorylation de IKBA et p65 d'une façon PKCε-dépendante (THOMPSON *et al.*, 2008). Par ailleurs, des cellules HUVECs stimulées par LTC<sub>4</sub> sont capables d'augmenter leur production de Egr1, Egr2, Egr3 et COX-2 d'une via la voie PLCβ/InsP<sub>3</sub> (UZONYI *et al.*, 2006).

#### 2.4.3 Les protéines G

Puisqu'ils sont des GPCR, la transduction du signal commence avec la liaison du cysteinyl-leucotriènes qui induit un changement de conformation du CysLTR pour mener à l'échange du groupe GDP de la petite sous-unité pour un groupe GTP (MCCUDDEN *et al.*, 2005). Ensuite, la petite sous-unité -GTP peut se détacher de la grosse sous-unité et du récepteur et les deux sous-unités peuvent agir comme seconds messagers. La sous-unité reste attachée au récepteur (à la membrane) pendant tout ce temps. En général, l'activation de protéines Gα<sub>i/o</sub> via la petite sous-unité α<sub>i/o</sub>-GTP inhibe l'adénylyl cyclase (isoformes 1, 2, 3, 5, 6) et peut activer les Src tyrosines kinases tandis que l'activation de protéines Gα<sub>q/11</sub> via α<sub>q/11</sub>-GTP active la phospholipase Cβ et peut activer les tyrosine kinases de Bruton (Btk). L'activation des deux type de protéines G (particulièrement Gα<sub>i/o</sub>) peuvent également avoir des effets via leur grosse sous-unité ; activation de la phospholipase Cβ, inhibition (isoforme 1, 5 et 6) ou activation (isoforme 2, 4 et 7) de l'adénylyl cyclase, l'activation de la PI3K, l'activation de guanine nucleotide exchange factors (GEFs) et différents effets sur des canaux potassique et calciques. L'activation de la

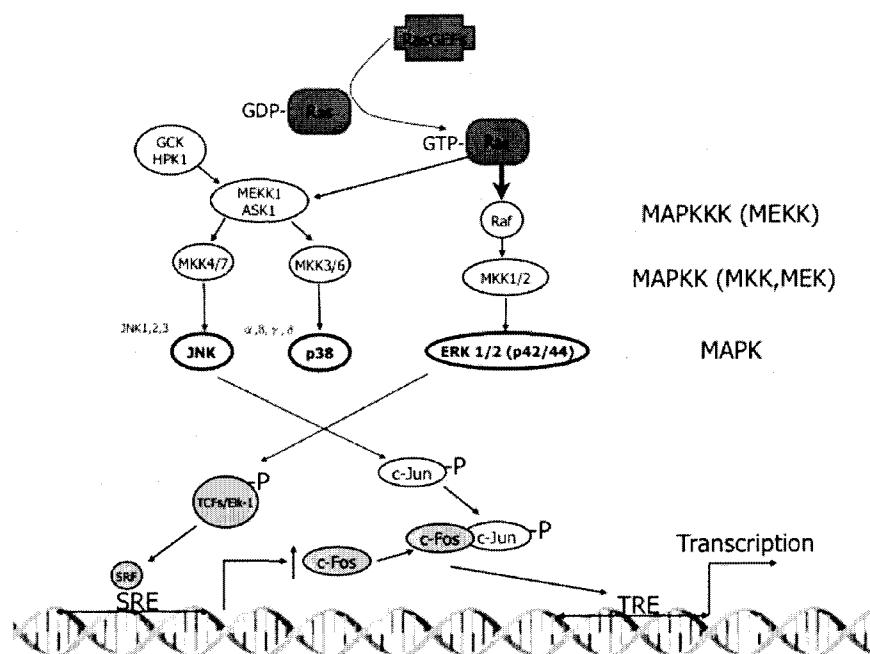
phospholipase C par  $\alpha_{q/11}$ -GTP se fait via la partie C-terminale de PLC tandis que l'activation par un domaine PH se fait via la partie N-terminal de PLC. Une fois PLC activée, elle est capable de cliver le phosphatidylinositol 4,5 diphosphate (PIP<sub>2</sub>) en deux nouveaux seconds messagers : diacylglycérol (DAG) qui reste accroché à la membrane et l'inositol 1,4,5-triphosphate (InsP<sub>3</sub>) qui est libre dans le cytosol. DAG peut activer des protéines kinase C (PKC) tandis que InsP<sub>3</sub> peut lier son récepteur sur le réticulum endoplasmique pour provoquer la relâche de calcium intracellulaire. L'activation de phosphoinositide 3-kinase (PI3K-IB;) par la sous-unité résulte en la phosphorylation de PIP<sub>2</sub> en phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP<sub>3</sub>). PIP<sub>3</sub> reste accroché à la membrane et peut être reconnue par des protéines avec un domaine PH comme par exemple PKB (Akt), PKC, PLC, des GEFs, PDK-1 et Btk (GUTKIND, 2000, LANDRY *et al.*, 2006).

#### 2.4.4 Les petites protéines G

Les petites protéines G (Small GTPase protein) sont composées de 5 familles : Ras, Rho (Rho, Rac, Cdc42), Rab, Arf/Sar, Ran. Ces protéines sont des monomères liant GDP lorsqu'elles sont inactives et GTP lorsqu'elles sont actives. Pour être activées, elles doivent interagir avec les GEFs. Les GEFs sont des protéines adaptatrices cytosoliques sans activité enzymatique et incluent par exemple les RasGEFs (ex : Sos1/2, GRF1/2) et les RhoGEFs (ex:p115RhoGef, Vav). L'activation des GEFs peut se faire via des domaines SH2 (tyrosine phosphorylée), via leur domaine PH liant PIP<sub>3</sub> ou la sous-unité et d'autres types de protéines G. Dans le contexte des protéines  $G\alpha_{i/o}$  ou  $G\alpha_{q/11}$ , l'activation via PIP<sub>3</sub> est particulièrement importante. Une fois les GEFs activées, elles peuvent interagir et activer spécifiquement leur petite protéine G en favorisant l'échange du groupement GTP vers un groupement GDP. Les petites protéines G activées ont plusieurs rôles, mais notons particulièrement l'activation de la voie de MAPKs en phosphorylant des MAPKKK (GUTKIND, 2000, LANDRY *et al.*, 2006).

### 2.4.5 Les MAPKs

Les mitogen-activated protein kinases (MAPKs) sont probablement le système de transduction du signal le plus étudié et sont impliqués dans un grand nombre de processus cellulaire comme la prolifération, la différenciation, la migration, l'apoptose, la réponse au stress, etc... Le fonctionnement de cette voie est classiquement divisé en trois étages de kinases : MAPK, MAPK kinase (MAPKK, MKK ou MEK), MAPKK kinase (MAPKKK ou MEKK). La transmission du signal est réalisée par une phosphorylation séquentielle des différentes kinases (voir Figure 6). Les MAPKKK, une fois activées par phosphorylation (voir plus bas), activent les MAPKK via la phosphorylation de deux sérines ou une sérine et une thréonine. Ensuite, les MAPKK peuvent activer les MAPKs via une phosphorylation de résidu thréonine ou tyrosine dans un motif T-X-Y. La famille des MAPKs est divisée principalement en 3; Extracellular signal-regulated kinases (ERKs), c-jun terminal kinases (JNKs) et les p38 (CHANG et KARIN, 2001).



**Figure 6 : Les voies des MAPKs**

Les différentes MAPKs peuvent être activées d'une façon indépendante (ex : Erk activé mais pas

JNK et p38) ou conjointement selon les kinases activés en amont, l'activité de différentes phosphatases, l'activité de certaines protéines chaperonnes, leur localisation intracellulaire et bien d'autres facteurs (RAMAN *et al.*, 2007). Une fois activés, les MAPKs peuvent phosphoryler des cibles dans le cytoplasme ou transloquer au noyau pour phosphoryler entre autre des facteurs de transcription, des co-activateurs et de protéines nucléosomales. Leur phosphorylation cible toujours une sérine ou un thréonine (elle sont des sérine/thréonine kinases) qui est suivi d'une proline (TURJANSKI *et al.*, 2007). Enfin, bien que la voie des MAPKs semble à première vue être linéaire (MAPKKK MAPKKMAPK), un grand nombre de «cross-talk» existe entre les différentes voies d'activation des différentes MAPKs tout comme avec d'autres voies de signalisation (ex : PKCs, PI3K). De plus, puisque plusieurs différentes MAPKKKs et MAPKKs existent, que chaque MAPKK peut être activé par plus d'une MAPKKK et que chaque MAPKKK peut être activé de plusieurs façons, la complexité de cette voie de signalisation est très élevée (RAMAN *et al.*, 2007, TURJANSKI *et al.*, 2007). L'activation des MAPKs requièrent souvent (mais pas toujours) l'activation de petites protéines G en amont comme par exemple Ras, RhoA et Rac. Par exemple, Ras est bien connu pour être capable de phosphoryler la MAPKKK Raf-1 pour mener à l'activation de ERK via MEK1/2. Aussi, Rac et Cdc42 peuvent phosphoryler MEKK ou MLKs pour mener à l'activation de JNK via MEK4 ou MEK7 (CHANG et KARIN, 2001, KAMINSKA, 2005).

#### 2.4.5.1 ERKs

Il existe deux principaux membres des ERKs : Erk1 et Erk2. La MAPKKK principale de la voie Erk1/2 est Raf-1 mais aussi Mos et Tpl2. Pour ce qui est des MAPKKs utilisés pour activer Erk et Erk2, notons principalement MEK1 et/ou MEK2. Une fois Erk1 ou Erk2 activé et transloqué au noyau, elles peuvent jouer sur la régulation génique en phosphorylant différents facteurs de transcription comme par exemple AP-1, Elk-1 (RAMAN *et al.*, 2007) et les STATs (PROFITA

*et al.*, 2008). Au niveau de AP-1, l'effet le mieux connu est l'augmentation de la synthèse de c-fos. La synthèse de c-fos peut être par exemple dû à la phosphorylation et activation de l'activité transcriptionnelle du complexe TCFs/Elk1 qui peut lier les serum-response factors (SRFs) qui eux sont liés au serum-response element (SRE) dans le promoteur de c-fos. Dans une moindre mesure, la phosphorylation de c-fos sur les résidus T325, 331 et S374 par Erk peut mener à l'augmentation de son activité transcriptionnelle et la stabilisation de son ARNm (HESS *et al.*, 2004). Il existe aussi Erk3, Erk5, Erk7 mais ils ont des fonctions et régulations distinctes. (TURJANSKI *et al.*, 2007)

#### 2.4.5.2 JNKs

Il existe trois membres des JNKs : Jnk1, Jnk2 et Jnk3. Les Jnk1 et Jnk2 sont exprimés d'une façon ubiquitaire tandis que Jnk3 est principalement retrouvé au niveau du cerveau, le cœur et les testicules. Les MAPKKKs de la voie des JNKs sont principalement MEKK1, 2, 3, 4 mais aussi les MLKs, Tpl2, les ASKs, les TAOs et TAK1. Pour ce qui est des MAPKKs pouvant activer les JNKs, les prédominantes sont MEK4 (MKK4, SEK1) et MEK7 (MKK7) (RAMAN *et al.*, 2007, TURJANSKI *et al.*, 2007). Une fois les JNKs activées, elles peuvent transloquer au noyau pour phosphoryler plusieurs facteurs de transcriptions comme par exemple AP-1, Elk1 et NFAT. Au niveau de AP-1, leur effet le mieux connu est la phosphorylation de c-jun par Jnk1 pour augmenter son activité transcriptionnelle et possiblement la stabilisation de son ARNm. Contrairement à Jnk1, Jnk2 est lié à c-jun en situation basale et augmente sa dégradation via un mécanisme ubiquitine-dépendant (HESS *et al.*, 2004).

#### 2.4.5.3 p38

Il existe 4 isoformes de p38 : p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$ , p38 $\delta$ . Les MAPKKKs de la voie des p38 sont principalement MEKK1,2,3,4, TAOs, TAK et ASKs. Les MAPKKs utilisés pour activer les p38 sont principalement MEK3 et MEK6 mais MEK4 peut également activer p38 (en plus de JNK)

dans certaines situations. MEK6 peut activer tous les isoformes tandis que MEK3 active seulement p38 $\alpha$ , p38 $\gamma$ , p38 $\delta$  et MEK6 active seulement p38 $\alpha$ . Tout comme ERK et JNK, p38 peut modifier la régulation génique en transloquant au noyau et phosphoryler des facteurs de transcription comme AP-1, Elk-1 et MEF2 (HESS *et al.*, 2004, KAMINSKA, 2005, TURJANSKI *et al.*, 2007).

#### 2.4.6 Les PKCs

Les protéines kinases sont une famille de sérine/thréonine kinase jouant un rôle dans la transduction du signal de plusieurs processus comme par exemple la prolifération, la différenciation, l'apoptose et l'angiogenèse. Les PKCs sont classés en trois groupes : les PKCs classiques (les cPKCs; PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ I, PKC $\beta$ II, PKC $\gamma$ ), les nouvelles PKCs (les nPKCs; PKC $\alpha$ , PKC $\delta$ , PKC $\epsilon$ , PKC $\eta$  et PKC $\theta$ ) et les PKCs atypiques (aPKCs; PKC $\zeta$  et PKC $\lambda$ ). Les PKCs classiques sont Ca<sup>2+</sup>-dépendante et peuvent être activés par la phosphatidylsérine (PS) ou DAG, les nouvelles PKCs sont Ca<sup>2+</sup>-indépendante et activés par PS ou DAG tandis que les PKCs atypiques sont Ca<sup>2+</sup>-indépendante et leur activité peut être régulé par PS (ou d'autres comme par exemple céramide, Ras et PI3K via PIP<sub>3</sub>) mais pas par DAG. Tous ces groupes peuvent aussi être différents dans leur structure, leur distribution, leur localisation et leur spécificité de substrat. Une fois activés, les PKCs peuvent à leur tour phosphoryler et activer plusieurs cibles (ex : MAPKs, IKK, les STATs, Sp1, etc..). Au niveau des MAPKs, certains isoformes des PKCs peuvent par exemple activer la MAPKKK Raf-1 menant à l'activation de Erk1/2. Bref, les PKCs peuvent activé les MAPKs (ERK, JNK et/ou p38) en phosphorylant des kinases en amont ou les MAPKS directement (MACKAY et TWELVES, 2007, YANG et KAZANIETZ, 2003).

#### 2.4.7 PI3K

L'action principale des PI3Ks, des kinases de lipides, est la génération de différents phosphoinositides qui sont d'importants seconds messagers. En réponse à divers stimuli, les

PI3Ks peuvent phosphoryler les phosphoinositides en position 3 de leur noyau inositol. Plusieurs produits peuvent être formés par les différentes PI3Ks, mais notons particulièrement le phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate (PIP<sub>3</sub>) qui est généré à partir de phosphatidylinositol 4,5 disphosphate (PIP<sub>2</sub>) comme mentionné plus haut (KOYASU, 2003). Les PI3Ks inclut 4 classes selon leur structure, mode d'activation et spécificité de substrat lipidique : IA, IB, II et III. Les classe IA et IB sont celles pouvant changer PIP<sub>2</sub> en PIP<sub>3</sub> et tout comme la classe II, elles contiennent un domaine pouvant lier et être activé par Ras. La classe IA est exprimée par toutes les cellules de mammifères et puisqu'elle contient des domaines SH2, elle est activée préférentiellement par des récepteurs tyrosines kinase ou avec l'aide de tyrosine kinase comme Src-family kinase ou JAK. La classe IB est exprimée majoritairement chez les leucocytes et peut être activée par la sous-unité des GPCRs (KOYASU, 2003, VANHAESEBROECK et WATERFIELD, 1999). Certaines cibles de l'activation de la PI3K sont par exemple Sp1 (WIERSTRA, 2008) et les MAPKs (KRASILNIKOV, 2000).

## **2.5 Implications dans la pathophysiologie de l'asthme**

Les cysLTs sont reconnus depuis longtemps pour leur effets bronchoconstricteurs et leur rôle dans la pathophysiologie de l'asthme (AUSTEN, 2008). D'ailleurs, diverses études ont montré un lien entre l'atopie ou l'asthme avec des polymorphismes du récepteur CysLT1 ou CysLT2 (ARRIBA-MENDEZ *et al.*, 2006, HAO *et al.*, 2006, SANZ *et al.*, 2006, THOMPSON *et al.*, 2007, THOMPSON *et al.*, 2003). De plus, des niveaux plus élevés de cysLTs ont été démontrés dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire (LLBA) (LAM *et al.*, 1988, WENZEL *et al.*, 1990) et les expectorations induites (MACFARLANE *et al.*, 2000, PAVORD *et al.*, 1999) de patients asthmatiques, tout comme une augmentation de l'excrétion urinaire de LTE<sub>4</sub> (indiquant une élévation des cysLTs) lors d'exacerbations de l'asthme (GREEN *et al.*, 2004). Fait intéressant, l'inhibiteur de la 5-LO Zileuton et des antagonistes spécifiques au récepteur CysLT1 (ex :



Montelukast) ont été montrés comme efficaces cliniquement dans le traitement de l'asthme (HOLGATE et POLOSA, 2008). Ces observations ne sont pas surprenantes lorsque l'on sait que la bronchoconstriction *in vitro* induite par 1 nM de LTC<sub>4</sub> ou LTD<sub>4</sub> est équivalent à 1000 nM d'histamine (DAHLEN *et al.*, 1983) et que l'inhalation de LTD<sub>4</sub> en aérosol produits des effets environ 1200x supérieur à l'histamine comme agent bronchoconstricteur (DRAZEN, 1986).

En plus de leur effet de bronchoconstriction, les cysLTs ont un rôle dans l'initiation de l'inflammation des voies respiratoires *in vivo* via le recrutement de différents leucocytes effecteurs. Par exemple, l'instillation de LTE<sub>4</sub> endobronchique chez l'humain augmente le nombre d'éosinophiles et de neutrophiles dans le LLBA (LAITINEN *et al.*, 1993) et les cysLTs augmente la migration transendothéliale des cellules progénitrices CD34<sup>+</sup> périphériques (BAUTZ *et al.*, 2001). D'ailleurs, la stimulation de cellules dendritiques ou THP-1 avec LTD<sub>4</sub> résulte en l'augmentation de la synthèse de la chimiokine IL-8 (importante pour le chimiotactisme de neutrophile) via CysLT1 (THOMPSON *et al.*, 2006), tout comme la stimulation de HUVECs par LTC<sub>4</sub> via CysLT2 (THOMPSON *et al.*, 2008). *In vitro*, le prétraitement des monocytes humains ou macrophages dérivés des monocytes avec IL-4 ou IL-13 augmente l'expression de CysLT1 à leur surface ainsi que leur réponse chimiotactique à LTD<sub>4</sub> (THIVIERGE *et al.*, 2001). Un rôle dans le chimiotactisme des cellules dendritiques et des lymphocytes T a également été montré (PETERS-GOLDEN et HENDERSON, 2007). Les cysLTs sont aussi bien connus pour augmenter la microperméabilité vasculaire via leur effet de rétraction sur l'endothélium des veinules post-capillaires bronchiques. De plus, ils peuvent augmenter la sécrétion de mucus via leur effet sur les cellules à goblet ainsi que de réduire sa clairance en diminuant l'activité des cils des cellules épithéliales (NICOSIA *et al.*, 2001). Également, l'activation/maturation/survie de certains types cellulaires peut être augmenté par ceux-ci. Par exemple, les cysLTs facilitent la maturation des cellules dendritiques de souris stimulées *ex vivo* par l'allergène Der f tandis que l'utilisation d'antagonistes spécifiques à

CysLT1 l'inhibe totalement (MACHIDA *et al.*, 2004). L'activation des mastocytes par le «cross-link» de leur récepteur Fc causant la sécrétion de IL-5 et TNF- $\alpha$  est en partie dépendante des cysLTs, tout comme leur capacité de prolifération. (KANAOKA et BOYCE, 2004). De plus, l'interaction entre les éosinophiles et les cysLTs augmente leur différenciation, leur survie et leur activation/dégranulation (BANDEIRA-MELO et WELLER, 2003). Récemment, LTD<sub>4</sub> a aussi été montré comme capable d'augmenter la production d'IgG et d'IgE chez des lymphocytes B humains activés par CD40 *in vitro* (LAMOUREUX *et al.*, 2006). Enfin, les cysLTs auraient un rôle dans l'état d'hyper-réactivité bronchique (CAPRA *et al.*, 2007), un processus résultant d'une interaction entre différents médiateurs des voies respiratoires enflammées (ex : cysLTs, prostanoïdes, enzymes protéolytiques, kinines) et le remodelage (HOLGATE, 2008).

## **2.6 Rôles dans le remodelage**

En plus de leur rôle dans la pathophysiologie de l'asthme, les cysteinyl-leucotriènes sont de plus en plus mis en cause dans le processus de remodelage des voies respiratoires. Jusqu'à maintenant, (en plus de leur divers rôles pro-inflammatoires facilitant le remodelage) des implications des cysLTs ont été montrés dans l'hyperplasie/hypertrophie des cellules musculaires lisses, l'hyperplasie des cellules à mucus et l'augmentation de la production de mucus, la fibrose sous-épithéliale et l'accumulation de myofibroblastes (HOLGATE *et al.*, 2003). Par exemple, les cysLTs augmentent la prolifération de fibroblastes pulmonaires *in vitro* face à différents mitogènes et augmentent leur capacité de synthèse de collagène. Au niveau de cellules musculaires lisses bronchiques, l'augmentation de l'expression de CysLT1 à leur surface via TGF- $\beta$  et IL-13 a été associée à une augmentation de leur prolifération en réponse à LTD<sub>4</sub> (ESPINOSA *et al.*, 2003). De plus, le TGF- $\beta$  induit par LTD<sub>4</sub> via CysLT1 chez des cellules épithéliales comme A549 et NHBE a mené à l'augmentation de la prolifération de cellules musculaires lisses bronchiques d'une façon TGF- $\beta$ -dépendante (BOSSE *et al.*, 2008). De plus, la

stimulation de l'expression de la pro-protéine convertase furine chez des cellules THP-1 et monomac-1 par LTD<sub>4</sub> ainsi que la maturation consécutive de certains de ses substrats a mené à l'hypothèse que les cysLTs pourraient être impliqués dans la bioactivation de plusieurs facteurs fibrogénique/angiogénique du remodelage des voies respiratoires (THOMPSON *et al.*, 2008). Fait intéressant, le groupe de Henderson a montré que l'administration de Montelukast dans un modèle d'asthme murin réduisait l'infiltration éosinophilique, la sécrétion de mucus, l'hyperplasie de CMLs et la fibrose sous-épithéliale (HENDERSON *et al.*, 2002). Ce même groupe a par la suite montré avec le même modèle que non seulement il était possible de prévenir certaines composantes du remodelage, mais aussi de les traiter (réversibilité) (HENDERSON *et al.*, 2006). En fait, contrairement au traitement avec dexaméthasone, Montelukast a été en mesure de réduire l'hyperplasie de CMLs et la fibrose sous-épithéliale déjà installée (l'infiltration d'éosinophiles et la sécrétion de mucus étaient réversibles par les 2 traitements individuellement). Finalement, une étude chez des asthmatiques a montré que l'administration de Montelukast préalablement à l'exposition à une faible dose d'allergène réduisait l'augmentation des myofibroblastes visibles par biopsies bronchiques par rapport au placebo (KELLY *et al.*, 2006).

#### 2.6.1. Au niveau de l'angiogenèse

Actuellement, au meilleur de mes connaissances, seulement deux études démontrent un possible lien entre les cysLTs et l'angiogenèse. La première montre que LTC<sub>4</sub> peut stimuler l'angiogenèse *in vitro* chez des cellules endothéliales d'artère carotide bovine (KANAYASU *et al.*, 1989), tandis que la deuxième montre que LTC<sub>4</sub> ou LTD<sub>4</sub>, mais pas LTB<sub>4</sub>, induit l'angiogenèse *in vivo* dans un modèle de membrane chorioallantoïque de poulet d'une façon récepteur-dépendante (TSOPANOGLIOU *et al.*, 1994). Cependant, aucun mécanisme précis d'induction de l'angiogenèse n'a été montré dans ces études.

## **2.7 Liens entre les cysLTs et le VEGF**

Au meilleur de mes connaissances, il existe actuellement seulement 3 études montrant une possible implication des cysLTs dans la modulation du VEGF. Par exemple, autant chez des patients asthmatiques (KANAZAWA *et al.*, 2004) qu'un modèle d'asthme murin (LEE *et al.*, 2004), l'administration d'un antagoniste spécifique du récepteur CysLT1 peut réduire les niveaux de VEGF et l'extravasation plasmatique dans les voies respiratoires. Récemment, une étude portant sur la néphrotoxicité de la cyclosporine A (CsA) chez un modèle de rat a montré que l'administration de Montelukast conjointement à CsA pouvait réduire sa néphrotoxicité probablement via la diminution des niveaux de TGF- $\beta$  et de VEGF rénaux (ATAKAN *et al.*, 2008). Par contre, aucune de ces études n'a démontré les mécanismes précis d'interaction entre les cysLTs et la modulation du VEGF.

## **Partie 3 : LE VEGF (VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR)**

### **3.1 Historique**

La molécule Vascular Endothéliale Growth Factor (VEGF) a été découverte suite à des recherches sur l'angiogenèse et le cancer où elle occupe d'ailleurs un rôle central. C'est premièrement en 1968 que deux groupes indépendants ont démontré que des tumeurs relâchaient un «facteur angiogénique diffusible» (EHRMANN et KNOTH, 1968, GREENBLATT et SHUBI, 1968). Ensuite, en 1983 le groupe de Senger a réussi à purifier un facteur ayant la capacité d'augmenter la perméabilité vasculaire et de causer l'accumulation d'ascites dans des tumeurs à partir d'une lignée cellulaire de carcinome (SENGER *et al.*, 1983). Ils ont appelé ce facteur «Vascular Permeability Factor (VPF)». En 1989, le groupe de Ferrara a isolé une protéine ayant une activité mitogénique envers les cellules endothéliales à partir d'un médium conditionné de cellules folliculaires d'hypophyse bovine. Dû à l'activité mitogénique endothélium-spécifique, ils ont nommé cette protéine «Vascular Endothelial Growth Factor

(VEGF)» (FERRARA et HENZEL, 1989). À la fin de 1989, le groupe de Ferrara (avec Leung) et le groupe de Connolly ont simultanément et respectivement rapporté le clonage et le séquençage des protéines VEGF (LEUNG *et al.*, 1989) et VPF (CONNOLLY *et al.*, 1989) qui, d'une façon surprenante, se sont avérés être les mêmes. Depuis ce temps, l'intérêt de la communauté scientifique envers le VEGF, tout comme nos connaissances de ses rôles physiologiques ou pathologiques, ne cessent d'augmenter. Selon certains, elle pourrait même devenir la «molécule de la décennie» (WALTERS *et al.*, 2008).

### **3.2 Famille du VEGF**

La famille du VEGF comporte sept glycoprotéines sécrétées nommées: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, Placental growth factor (PIGF) et VEGF-F. Tous ces membres sont sous la forme de dimère et partagent une structure commune de 8 résidus cystéine placés d'une façon caractéristique (formant la structure typique «cystine-knot») dans un domaine d'homologie VEGF. Les rôles des membres de cette famille sont distincts ou redondants selon plusieurs facteurs comme par exemple les récepteurs et co-récepteurs qu'ils utilisent ou leur niveau d'expression selon le type cellulaire (OTROCK *et al.*, 2007).

#### **3.2.1. VEGF-A**

Le VEGF-A (ou simplement VEGF) est le membre le plus étudié et le mieux connu de la grande famille du VEGF. Le VEGF est une protéine retrouvée sous forme d'homodimère d'environ 45-46 kD (23 kD chaque monomère) assemblée d'une façon antiparallèle. Son gène est localisé sur le chromosome 6 (6p12-p21), est formé de 8 exons séparés par 7 introns, fait environ 14 kB et son promoteur ne contient pas de boîte TATA (BREEN, 2007, PAGES et POUYSSEGUR, 2005). Son ARNm peut subir de l'épissage alternatif pour donner plusieurs isoformes différents d'une façon tissu spécifique. Jusqu'à maintenant, 7 variants ont été identifiés: VEGF-A<sub>206</sub> (isoforme 1), VEGF-A<sub>189</sub> (isoforme 2), VEGF-A<sub>183</sub> (isoforme 3), VEGF-A<sub>165</sub> (isoforme 4),

VEGF-A<sub>145</sub> (isoforme 5), VEGF-A<sub>121</sub> (isoforme 6), VEGF-A<sub>165b</sub> (isoforme 7). Les exons 1 à 5 sont commun à tous les isoformes du VEGF, tandis que les exons 6 à 8 sont différenciellement épissés. Fait important, les différents variants ont des biodisponibilités différentes. En effet, les plus petits comme VEGF-A<sub>121</sub> sont presque uniquement sécrétés librement (diffusible) dans le milieu extracellulaire, tandis que les plus gros comme VEGF-A<sub>206</sub> sont fortement liés avec la matrice extracellulaire ou la surface cellulaire via leur interaction avec des protéoglycans contenant l'héparine (HOLMES et ZACHARY, 2005). Les gros isoformes peuvent être libérés de la matrice extracellulaire ou de la surface cellulaire pour devenir diffusible via l'action d'enzyme comme l'héparinase ou l'activation de protéases comme la plasmine ou certaines métalloprotéase (ex : MMP-9) qui agissent en clivant la partie C-terminale du VEGF (BREEN, 2007, PARIKH et ELLIS, 2004). À propos du VEGF-A<sub>165</sub>, cet isoforme est situé environ à mi-chemin, c'est-à-dire qu'il est à la fois diffusible et à la fois séquestré à la surface cellulaire et dans la matrice extracellulaire. VEGF-A<sub>165</sub> est l'isoforme prédominant en quantité et qui semble être le plus important pour les fonctions biologiques du VEGF. D'un autre côté, les isoformes VEGF-A<sub>145</sub> et VEGF-A<sub>183</sub> sont relativement rares (FERRARA *et al.*, 2003, HOLMES et ZACHARY, 2005). Tous ces variants sont capable de lier les récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 mais certains lient différemment les co-récepteurs. L'importance biologique de ces variants n'est pas encore bien comprise mais l'on sait que leurs fonctions distinctes ou redondantes pourraient être reliées aux différences dans leur expression (parfois tissu spécifique ou changeant selon les stimuli et conditions pathophysiologiques), leur biodisponibilité et leur liaison aux co-récepteurs neuropilines (FERRARA *et al.*, 2003, ROBINSON et STRINGER, 2001).

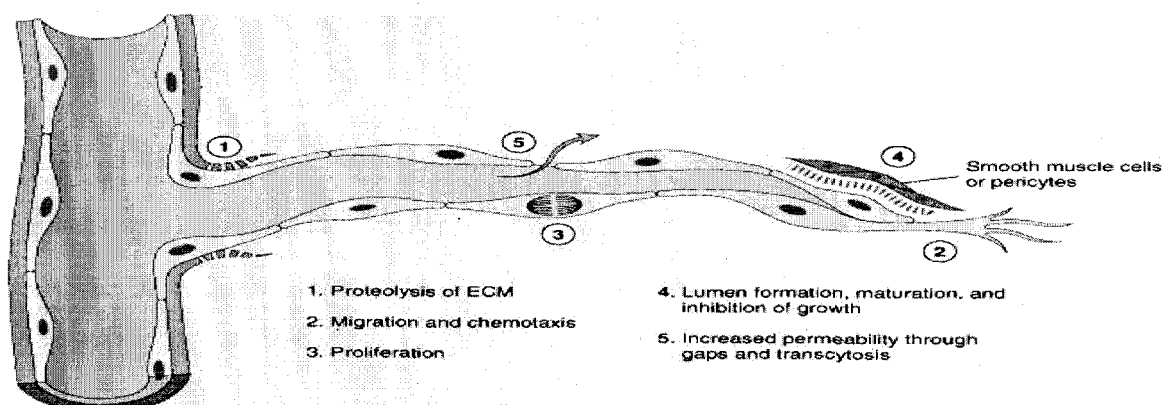
### 3.2.1.1 Profil d'expression

Premièrement, le VEGF est exprimé par un très grand nombre de cellules tumorales comme les cellules de l'adénocarcinome pulmonaire, du carcinome de la vessie, du cancer colorectal et les

cellules HL-60, les U937, etc. Dans les cellules non tumorales, il est présent par exemple chez les monocytes, les macrophages, les kératinocytes, l'épithélium viscéral glomérulaire et cellules mésangiales du rein, les hépatocytes, les cellules musculaires lisses, les cellules de Leydig, les fibroblastes, les chondrocytes, et bien d'autres (R&D, 2008). Plus spécifiquement au niveau des poumons, le VEGF est exprimé par les macrophages alvéolaires, les éosinophiles, les mastocytes, les lymphocytes T, l'épithélium, les cellules musculaires lisses, les myofibroblastes et les fibroblastes (HOSHINO *et al.*, 2001, KAMIO *et al.*, 2008). Son expression par les cellules endothéliales elles-mêmes est faible ou nulle sauf en condition hypoxique (LIU *et al.*, 1995).

### 3.2.1.2. Angiogenèse et autres fonctions

Premièrement, il est important de distinguer les différents processus du développement et maintien du système vasculaire. Chez l'embryon, les premières ébauches du système vasculaire se forment par la vasculogénèse, c'est-à-dire la différenciation et l'organisation de progéniteurs de cellules endothéliales (angioblastes) en un plexus primaire de capillaires (CARMELIET, 2000). Chez l'adulte, la croissance des vaisseaux sanguins se fait principalement par deux mécanismes : l'artériogénèse et l'angiogénèse. L'artériogénèse signifie le remodelage d'anastomoses artério-artériolaires préexistantes en artères complètement développées et fonctionnelles. Pour ce qui est de l'angiogénèse, il s'agit de la formation de nouveaux capillaires à partir de vaisseaux préexistants (voir Figure 7).



**Figure 7 : Étapes de l'angiogenèse (ROBBINS, 2002)**

Les facteurs déclenchants ces processus sont bien différents : les forces de cisaillement (après une sténose par exemple) sont le facteur majeur pour l'artériogénèse tandis que l'hypoxie est le facteur majeur pour l'angiogénèse (bien qu'il y en existe bien d'autres pour chacun) (HEIL *et al.*, 2006). D'une façon similaire à l'angiogénèse, le développement du réseau lymphatique se fait via la lymphangiogénèse (CARMELIET, 2000). Deux mécanismes ont été décrits pour expliquer le fonctionnement de l'angiogénèse : l'intussusception et le bourgeonnement. L'intussusception est une alternative bien réelle mais peu comprise par rapport au bourgeonnement. En fait, ce phénomène augmente la densité capillaire en séparant les vaisseaux préexistants. Pour ce faire, il y a formation et insertion de replis et colonnes de tissus interstiels dans la lumière du vaisseau pour le diviser en capillaires distincts. Pour sa part, le bourgeonnement est le mécanisme classique et le plus étudié qui inclut plusieurs étapes séquentielles importantes (HEIL *et al.*, 2006). D'abord, il y a augmentation de la perméabilité vasculaire qui cause l'extravasation de protéines plasmatiques qui serviront de support à la migration des cellules endothéliales. Ensuite, il doit y avoir déstabilisation des vaisseaux sanguins préexistants; les cellules endothéliales doivent perdre leur contact intercellulaire entre elles-mêmes et envers les cellules de support comme les péricytes. La matrice extracellulaire et la membrane basale doivent aussi être dégradées pour «libérer le chemin» pour les prochaines étapes. Ainsi, il peut y avoir «bourgeonnement» via la prolifération et migration des cellules endothéliales. Les cellules endothéliales formeront ensuite une «chaîne solide» avant d'acquérir une lumière pour former une structure en tube. Par la suite, il y a un phénomène de maturation qui implique une augmentation de la survie, une inhibition de la prolifération des cellules endothéliales et le recrutement de cellules de support comme les péricytes pour stabiliser le vaisseau naissant. Selon l'environnement présent et le type de tissu, l'endothélium peut aussi se différencier avec des caractéristiques accommodant la physiologie locale requise. Par exemple, l'endothélium de glandes endocrines est impliqué dans beaucoup d'échange de particules et doit



être discontinué et fenestré (CARMELIET, 2000, HEIL *et al.*, 2006, PATHO). Toutes ces étapes sont sous le contrôle d'un grand nombre de médiateurs. En fait, l'angiogenèse est un phénomène physiologique complexe et strictement régulé résultant de la balance entre des facteurs pro-angiogéniques et des facteurs angiostatiques. Les facteurs pro-angiogéniques peuvent inclure des ligands de récepteurs tyrosines kinases présents sur les cellules endothéliales comme certains membres de la grande famille du VEGF et l'angiopoïétine-1 et -2 (en présence d'une grande quantité de VEGF), de nombreux facteurs de croissance comme le bFGF, EGF, HGF, PDGF, des interactions entre EphrinB2-EphB4, la voie du Delta-Notch et certaines intégrines. D'autres médiateurs sont aussi impliqués comme l'angiogénine, des métalloprotéases, des cytokines, des chimiokines comme l'IL-8 et MCP-1. Les facteurs angiostatiques sont par exemple l'endostatine, angiopoïétine-2 (en présence d'une faible quantité de VEGF), l'angiostatine, la constatine, la tumstatine, l'arresten, la thrombospondine-1, BMP4 et la chondromoduline (CARMELIET, 2005, FERRARA et KERBEL, 2005, OTROCK *et al.*, 2007).

Jusqu'à maintenant, le VEGF est le plus puissant facteur pro-angiogénique connu. En fait, il est impliqué dans presque toutes les phases de l'angiogenèse comme par exemple la prolifération, la dégradation de la membrane basale, la migration, la formation de structures en tube, l'augmentation de la survie et l'activation des cellules endothéliales (OTROCK *et al.*, 2007). Son rôle pro-angiogénique est reconnu autant pour l'angiogenèse physiologique, inflammatoire et/ou tumorale. Par exemple, il est impliqué dans les processus de guérison tissulaire, de menstruation et de grossesse mais il joue également un rôle de support à la croissance ou à la métastase de presque tous les types de tumeurs solide (ex : colorectal) et de quelques types de tumeurs hématologiques. En situation inflammatoire, le VEGF peut contribuer à l'angiogenèse comme dans le cas du psoriasis, l'athérosclérose, l'arthrite rhumatoïde, la néphropathie diabétique et de l'asthme (BREEN, 2007, PARIKH et ELLIS, 2004). Son rôle physiologique est clairement démontré par le fait que des souris knock out homozygotes ou hétérozygotes de

VEGF-A meurent au stade de l'embryon à cause de malformations vasculaires et de défauts cardiovasculaires (CARMELIET *et al.*, 1996).

Le VEGF-A est aussi associé à la vasculogénèse et peut causer l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la vasodilatation vasculaire et favoriser la coagulation (ROY *et al.*, 2006). Ensuite, même si les études sur le VEGF-A ont largement ciblées l'endothélium, le VEGF a d'autres rôles moins connus pouvant être expliqués par la présence de ses récepteurs sur d'autres types cellulaires. Par exemple, il y a la mobilisation de cellules souches hématopoïétiques, la chimiotaxie de monocytes, la formation osseuse via les ostéoblastes, la prolifération des cellules épithéliales pigmentales de la rétine, la prolifération des cellules de Schwann, la prolifération et migration des cellules musculaires lisses vasculaires et des effets neuroprotecteurs sur les neurones moteurs en hypoxie (OTROCK *et al.*, 2007, ROY *et al.*, 2006). Finalement, chez un modèle de souris transgénique pour VEGF165 exprimé spécifiquement aux poumons, le VEGF peut induire un phénotype «asthma-like» avec inflammation de type Th2, remodelage vasculaire, remodelage parenchymateux et hyper-réactivité bronchique. De plus, cette même étude a montré que le VEGF facilitait la sensibilisation aux antigènes respiratoires et augmentait le nombre de cellules dendritiques DC2 activées (HENDERSON *et al.*, 2002). Fait intéressant, des polymorphismes dans la séquence du VEGFR1 (PARK *et al.*, 2008) et du VEGFR2 (PARK *et al.*, 2006) sont associés à l'atopie (et l'hyperréactivité bronchique dans le cas de VEGFR1).

### 3.2.2 Autres membres

Par rapport au VEGF-A, le VEGF-B est faiblement mitogénique pour les cellules endothéliales, n'est pas inductible par l'hypoxie et lie seulement VEGFR1. Deux isoformes existent; VEGF-B167 et VEGF-B186. Le rôle précis *in vivo* de VEGF-B n'est pas bien connu mais il semblerait être impliqué dans le métabolisme énergétique, l'artériogénèse et l'angiogénèse physiologique ou inflammatoire. Le VEGF-C et VEGF-D lient seulement VEGFR2 et VEGFR3 et sont

synthétisés sous forme de précurseurs nécessitant l'activation par des pro-protéines convertases comme la furine, PC5 ou PC7. Le rôle de VEGF-C *in vivo* sont par exemple la lymphangiogenèse, la chimiotaxie des macrophages, la perméabilité vasculaire et possiblement un faible impact sur l'angiogenèse. Tout comme VEGF-C, VEGF-D a un impact majeur dans la lymphangiogenèse mais son rôle dans l'angiogenèse semble être plus important que le VEGF-C. Les deux plus récents membres de la famille du VEGF, VEGF-E et VEGF-F, ne sont pas présents dans le génome des mammifères. Le VEGF-E se retrouve dans le génome du virus Orf et existe sous au moins 3 isoformes : VEGF-E<sub>NZ7</sub>, VEGF-E<sub>NZ2</sub> et VEGF-E<sub>D1701</sub>. Le VEGF-E lie spécifiquement VEGFR2 et est un bon facteur pro-angiogénique. Pour ce qui est du VEGF-F (aussi appelé sn-VEGF pour «snake-derived» VEGF), il a été isolé à partir du venin de vipère et est composé de deux sous-unités: vammin et VR-1. Tout comme VEGF-E, il lie spécifiquement VEGFR2 et a une bonne activité pro-angiogénique. Enfin, le Placental growth factor (PIGF) originalement découvert dans le placenta mais maintenant connu comme étant aussi exprimé dans les poumons et le cœur, lie seulement VEGFR1. Fait intéressant, des hétérodimères de PIGF avec VEGF-A ont été décrit et peuvent se lier et activer VEGFR2. Jusqu'à maintenant, 4 isoformes ont été découverts : PIGF-1, PIGF-2, PIGF-3, PIGF-4. Ses fonctions sont probablement au niveau de l'artériogenèse, l'angiogenèse, la perméabilité vasculaire et l'inflammation (OTROCK *et al.*, 2007, ROY *et al.*, 2006).

### **3.3 Récepteurs**

La famille du VEGF médie leurs effets biologiques via des récepteurs de type tyrosine kinase. Au repos, ces récepteurs existent sous forme de monomères transmembranaires. Après la liaison du ligand VEGF avec le domaine extracellulaire du récepteur, il y a homodimérisation des chaînes ce qui mène à une autophosphorylation des domaines tyrosine kinases intracellulaires. Ensuite, ces tyrosines phosphorylées peuvent servir de site de liaison à des protéines adaptatrices

pour déclencher différents signaux de transduction (OTROCK *et al.*, 2007).

### 3.3.1 VEGFR1 (Flt-1)

Le récepteur VEGFR1 (ou Fms-like tyrosine kinase; Flt-1) est composé de 7 domaines «immunoglobulin-like» extracellulaires, une région transmembranaire, de deux domaines tyrosine kinase intracellulaire divisées par un «kinase insert» et se terminant par une queue cytoplasmique en C-terminale. Il est seulement en mesure de lier VEGF-A, VEGF-B et PlGF. Dès le développement d'un embryon, il est exprimé sur les angioblastes, l'endothélium vasculaire et les trophoblastes du placenta tandis qu'après ce stade, il est également exprimé sur les péricytes, ostéoblastes, monocytes/macrophages, cellules mésangiales rénales, progéniteurs de cellules endothéliales et quelques cellules souches hématopoïétiques (OTROCK *et al.*, 2007, ROY *et al.*, 2006). Tout comme le VEGF-A, son expression au niveau transcriptionnelle peut être modulée par l'hypoxie via HIF-1 (GERBER *et al.*, 1997). Le rôle de VEGFR1 dans l'angiogenèse n'est pas encore parfaitement compris. Il a d'abord été considéré comme un «decoy» récepteur à cause de sa haute affinité pour le VEGF et une faible activité tyrosine kinase (FERRARA *et al.*, 2003). D'ailleurs, les souris knock out VEGFR1  $-/-$  meurt in utéro non pas d'un manque de vascularisation, mais d'une hyper-vascularisation inadéquate et malformée. Au stade du développement, VEGFR1 jouerait donc effectivement le rôle de «decoy receptor» en régulant l'accessibilité du VEGF pour VEGFR2 (FONG *et al.*, 1999). Après la naissance, des évidences démontrent qu'il aurait également un certain rôle positif à jouer dans l'angiogenèse (particulièrement inflammatoire) via la chimiotaxie des monocytes/macrophages (FERRARA et KERBEL, 2005) ou en formant un hétérodimère avec VEGFR2 (ROY *et al.*, 2006). Une forme soluble du VEGFR1 existe (sVEGFR1) et a été montré comme étant capable d'inhiber la prolifération de cellules endothéliales en réponse au VEGF (OTROCK *et al.*, 2007).

### 3.3.2 VEGFR2 (KDR)

Le récepteur VEGFR2 (ou Kinase Insert Domain-containing Receptor; KDR) a la même structure générale que le VEGFR1. Les ligands pouvant s'y lier sont le VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E et le VEGF-F. Il est exprimé chez les cellules endothéliales vasculaires, les neurones, les ostéoblastes, les mégakaryocytes, les cellules des conduits pancréatiques, les progéniteurs de cellules endothéliales et des cellules souches hématopoïétiques. Bien que son affinité pour VEGF-A est moins élevée que dans le cas de VEGFR1, son activité tyrosine kinase est supérieure et il est considéré comme le récepteur le plus important (bien devant VEGFR1) dans l'effet pro-angiogénique du VEGF-A (OTROCK *et al.*, 2007, ROY *et al.*, 2006). Conséquemment, les souris knock out VEGFR2 *-/-* meurt in utero à cause d'un défaut dans la formation de la vasculature (SHALABY *et al.*, 1995). Contrairement à VEGF-A et VEGFR1, l'hypoxie n'augmente pas sa transcription via HIF-1 (GERBER *et al.*, 1997). Enfin, des cross-talk peuvent avoir lieu entre la signalisation de VEGFR1 et de VEGFR2 (ROY *et al.*, 2006).

### 3.3.3 VEGFR3 (Flt-4)

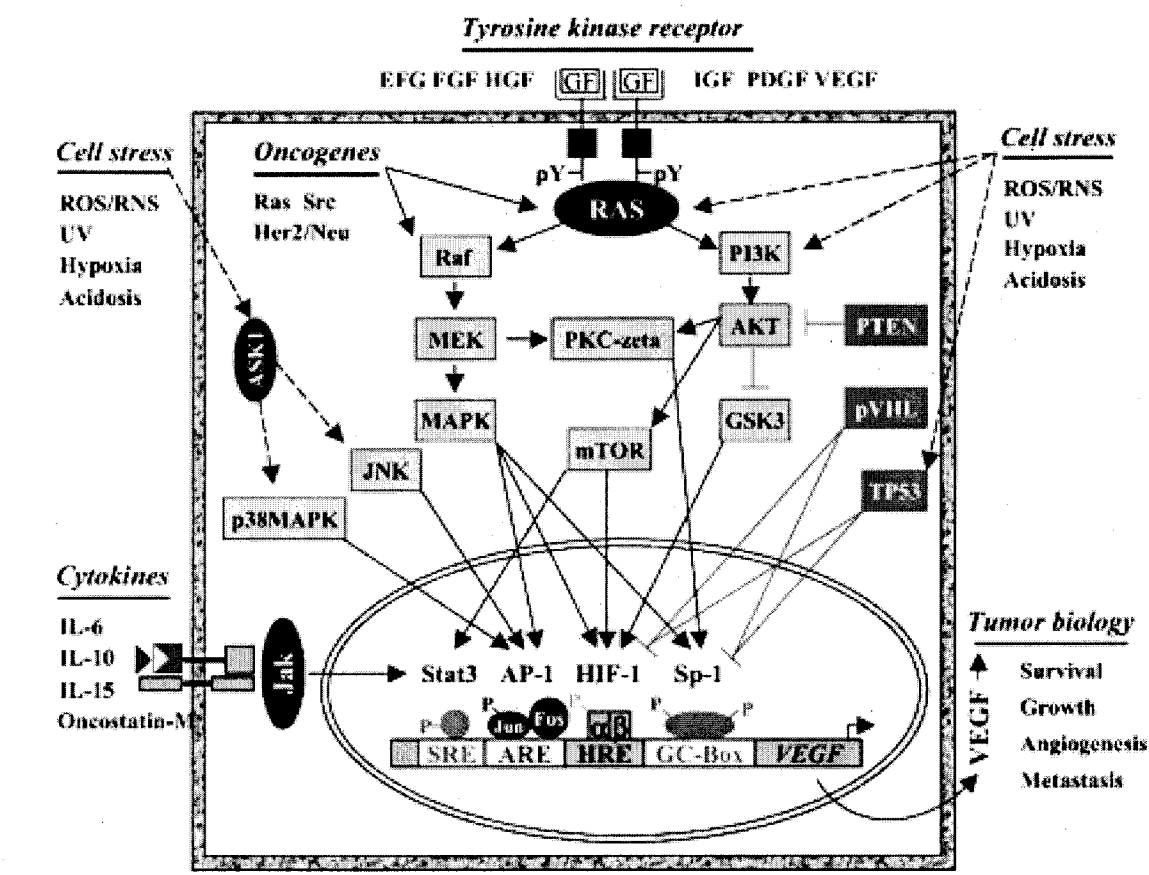
Contrairement au VEGFR1 et VEGFR2, le VEGFR3 (ou Fms-like tyrosine kinase 4; Flt-4) a seulement 6 domaines «immunoglobulin-like» et lie préférentiellement VEGF-C et VEGF-D. Il est également composé d'un domaine transmembranaire, deux domaines tyrosine kinase intracellulaire divisés par un «kinase insert» et se termine par une queue cytoplasmique en C-terminal. Chez l'humain, 2 isoformes existent qui diffèrent selon leur région C-terminal. Son expression est surtout au niveau de l'endothélium lymphatique et de l'endothélium vasculaire embryonnaire ou pathologique (ex : tumeur). Son rôle dans l'angiogenèse (faible par rapport aux 2 autres récepteurs) serait surtout pour les vaisseaux sanguins embryonnaires et n'aurait presque plus aucun impact après leur maturation. En fait, son rôle majeur est dans la lymphangiogenèse (OTROCK *et al.*, 2007).

### 3.3.4 Co-récepteurs

D'abord identifiés comme récepteurs pour les sémaphorines/collapsins ayant un rôle dans le développement neuronal, les glycoprotéines de surface cellulaire appelé neuropilines jouent aussi le rôle de co-récepteur pour certains membres de la famille du VEGF (OTROCK *et al.*, 2007). Neuropiline-1 (NP-1) peut lier VEGF-A121, VEGF-A165, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E et PIGF-2 tandis que NP-2 peut lier VEGF-A145, VEGF-A165, VEGF-C et VEGF-D (GERETTI *et al.*, 2008). Les deux neuropilines sont exprimés sensiblement aux mêmes endroits, c'est-à-dire dans les systèmes nerveux, cardiovasculaire et squelettique lors de l'embryogenèse, et dans l'endothélium vasculaire, les poumons, le cœur, le foie, les reins, le pancréas, les ostéoblastes et les cellules stromales de la moelle osseuse chez l'adulte. NP-2 est également exprimé sur l'endothélium lymphatique (OTROCK *et al.*, 2007, ROY *et al.*, 2006). Par rapport aux autres récepteurs du VEGF, les co-récepteurs neuropilines n'ont pas de domaine tyrosine kinase intracellulaire et n'ont donc pas la capacité de transduction du signal lorsqu'ils lient des membres de la famille du VEGF. En fait, ils sont composés d'un large domaine extracellulaire, un court domaine transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique sans séquence consensus de signalisation connu jusqu'à maintenant (GERETTI *et al.*, 2008). Cependant, NP-1 est connue pour être capable d'augmenter les interactions entre VEGF-A et VEGFR2 et la force des signaux de transduction résultant en interagissant avec VEGFR2 lié à VEGF-A. NP-1 peut aussi augmenter l'angiogenèse particulièrement dans les cas de tumeurs et a un rôle dans le développement cardiovasculaire en régulant les niveaux de VEGF-A165 (OTROCK *et al.*, 2007). D'ailleurs, un knock out de NP-1 chez la souris mène à la mort in utero à cause des défauts de formation du système vasculaire (KAWASAKI *et al.*, 1999). Des mutations de NP-2 peuvent également mener à des troubles dans la formation de lymphatiques chez la souris (YUAN *et al.*, 2002). Comme VEGFR1, une variante soluble de NP-1 (sNP-1) existe et il peut agir comme antagoniste naturel de VEGF-A165 envers sa liaison à VEGFR2 (PARIKH et

ELLIS, 2004). In vitro, NP-1 et NP-2 sont tous capable d'interagir avec VEGFR1 via VEGF, mais la signification biologique reste encore à déterminer (GERETTI *et al.*, 2008).

### 3.4 Modulation du VEGF



**Figure 8 : Voies de signalisation et facteurs impliqués dans la modulation du VEGF (XIE *et al.*, 2004)**

#### 3.4.1 Facteurs régulant le VEGF

Le VEGF est un facteur de croissance pouvant être modulé par un nombre impressionnant de différents facteurs (voir Figure 8). Son expression peut parfois être constitutive, particulièrement dans le cas de tumeurs, ou inducible. Dans le cas de l'expression constitutive, elle a surtout lieu après des modifications génétiques qui activent des oncogènes (ex : Ras, Src, HER2/neu, Bcr/Abl) ou qui inactivent des gènes suppresseurs de tumeurs (ex : VHL, p53, p73, PTEN, p16,

BRCA1). Ces altérations génétiques ont pour conséquences d'affecter les fonctions/productions des facteurs de transcriptions impliquer dans la transcription du VEGF ou de stabiliser son ARNm (XIE *et al.*, 2004). Pour ce qui est des facteurs environnementaux ayant un rôle d'induction du VEGF, notons par exemple l'hypoxie (le facteur majeur), l'acidose, les rayons UVB, le sevrage en sérum, le stress oxydatif via les ROS, les radiation ionisantes, les déficiences en glucose (XIE *et al.*, 2004), les forces mécaniques cycliques imposées aux cellules musculaires lisses pulmonaires (HASANEEN *et al.*, 2007), la densité cellulaire (KOURA *et al.*, 1996) et le plomb (JOSKO et MAZUREK, 2004). Enfin, plusieurs différentes cytokines et facteurs de croissance sont aussi impliqués dans l'induction du VEGF dans différents contextes. Pour les cytokines, notons par exemple l'IL-1b, IL-3, IL-6, IL-13, IL-15, IL-18, TNF- $\alpha$  tandis que les facteurs de croissances sont par exemple EGF, KGF, bFGF, FGF4, PDGF, HGF et le TGF- $\beta$ . L'acide rétinoïque et les estrogènes peuvent aussi induire le VEGF-A (JOSKO et MAZUREK, 2004, PAGES et POUYSSEGUR, 2005, XIE *et al.*, 2004). Au meilleur de mes connaissances, les seuls médiateurs lipidiques démontrés comme ayant un rôle direct dans l'induction de l'expression du VEGF-A sont les prostaglandines PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>1</sub> (XIE *et al.*, 2004) et PGI<sub>2</sub> (ATSUTA *et al.*, 2009, JOSKO et MAZUREK, 2004).

### 3.4.2 Régulation transcriptionnelle

La régulation de l'expression du VEGF-A par la transcription est la voie la plus intensément étudiée parce qu'elle semble être la plus importante. L'analyse du promoteur «classique» du VEGF-A (sans boîte TATA) d'une longueur d'environ 2300 paires de base démontre d'ailleurs un grand nombre de sites de liaison à différents facteurs de transcription : HIF-1, Sp-1/Sp-3, AP-1, Stat3, Egr-1, AP-2, NF-IL6, NF-1, Smad 3-4, c-myc, récepteurs d'estrogène, récepteurs de progestérone, liver X receptors (JOSKO et MAZUREK, 2004, MIZUKAMI *et al.*, 2006, MUELLER *et al.*, 2000, PAGES et POUYSSEGUR, 2005, TISCHER *et al.*, 1991, XIE *et al.*,



2004). Contrairement à la souris, le promoteur du VEGF-A humain ne contient pas de région consensus pour NF $\kappa$ B (PAGES et POUYSSEGUR, 2005). Ce grand nombre de possibilité de liaison démontre toute la complexité de la régulation transcriptionnelle du VEGF. De plus, pour que l'activité transcriptionnelle soit à son maximum, il peut être nécessaire d'avoir activation et coopération entre différents facteurs de transcription et/ou voies de signalisation. Cependant, il est possible de simplifier le tout en sachant que HIF-1, Sp1, AP-1 et Stat3 semblent être les facteurs les plus importants et les mieux caractérisés (PAGES et POUYSSEGUR, 2005, XIE *et al.*, 2004). Le gène du VEGF-A contient également un «Cryptic promoteur» dans une région initialement identifiée comme faisant seulement partie du 5'UTR. Un site d'initiation alternatif de la transcription est donc possible à +632 pb du site d'initiation «classique» (AKIRI *et al.*, 1998, PAGES et POUYSSEGUR, 2005).

#### 3.4.2.1 HIF-1

Le hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) est un facteur de transcription hétérodimérique du type basic hélix-loop-helix composé d'une sous-unité HIF-1 $\beta$  (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator; ARNT) constitutivement exprimée/active et d'une sous-unité HIF-1 $\alpha$  dont la stabilité et l'activité est variable. Ces deux sous-unités font partie de la grande famille bHLH-PAS (KE et COSTA, 2006). Le complexe HIF-1 peut reconnaître et lier des séquences consensus 5'-RCGTG-3' appelé hypoxia response element (HRE) présent dans un grand nombre de promoteurs (WEIDEMANN et JOHNSON, 2008). En fait, il existe plus de 70 protéines régulées par HIF-1 et elles sont surtout impliquées dans l'angiogenèse (ex VEGF et VEGFR1), l'érythropoïèse (ex: EPO), la prolifération/survie, le métabolisme du glucose et le métabolisme du fer (BRAHIMI-HORN *et al.*, 2005, SEMENZA, 2002). Deux autres membres de la famille bHLH-PAS existent; HIF-2 et HIF-3. HIF-2 est un homologue de HIF-1 qui peut aussi dimériser avec HIF-1 $\beta$  (ARNT) et lier les mêmes régions consensus HRE mais tout comme HIF3, il est

beaucoup moins caractérisé que HIF-1 $\alpha$  (WEIDEMANN et JOHNSON, 2008).

#### 3.4.2.1.1. Régulation en hypoxie

La partie HIF-1 $\alpha$  est la composante régulatrice majeure puisqu'en normoxie elle est rapidement dégradée tandis qu'en hypoxie elle est stabilisée et son activité transcriptionnelle est augmentée. La sous-unité HIF-1 $\alpha$  contient différents domaines; hHLH et PAS pour la dimérisation, TAD-N et TAD-C pour l'activité transcriptionnelle et l'«oxygen-dependent degradation domain (ODD)» essentiel à sa régulation en hypoxie. À propos de la stabilité de HIF-1, des enzymes comme les prolyl hydroxylases (PHD), les HIF prolyl hydroxylases (HPH) et les ARD1 acetyltranferases ont la particularité d'être principalement actives lorsqu'elles sont en normoxie; elles agissent donc comme des «oxygen sensor». Ainsi, en présence d'oxygène les hydroxylases peuvent hydroxyler les résidus prolines 402 et 564 du domaine ODD, et ARD1 peut acétyler la lysine 532 de ce même domaine. Une fois ces résidus modifiés, la protéine pVHL (un gène suppresseur de tumeur) peut venir se lier à l'ODD plus facilement. La protéine pVHL fait partie d'un complexe protéique E3 ubiquitine-ligase qui permet l'ubiquitination de HIF-1 et sa dégradation via la voie du protéasome. Un certain rôle de la protéine p53 (également un gène suppresseur de tumeur) existe aussi via l'ubiquitination de HIF-1 $\alpha$  médié par Mdm-2. Pour ce qui est de l'activité transcriptionnelle, l'enzyme «factor inhibiting HIF-1 (FIH-1)» agit aussi comme «sensor» de l'oxygène. En présence d'oxygène, FIH-1 hydroxyle le résidu asparagine 803 du domaine de transactivation TAD-C de HIF-1 $\alpha$ , ce qui prévient son interaction avec des co-activateurs comme par exemple CBP/p300. De plus, FIH-1 peut lier pVHL d'une façon indépendante de son activité hydroxylase et mener au recrutement d'histones déacétylase qui interfèrent avec les fonctions des domaines de transactivation de HIF-1 $\alpha$ . Bref, en situation d'hypoxie il y a une accumulation et activation de HIF-1 $\alpha$  qui pourra se lier à son partenaire HIF-1 $\beta$  pour augmenter la transcription du VEGF (KE et COSTA, 2006, LEE *et al.*, 2004, WEIDEMANN et JOHNSON, 2008). Même

si en hypoxie l'induction du VEGF est principalement médiée d'une façon HIF-1-dépendante, il existe également des voies HIF-indépendante pour cette régulation pouvant impliquer par exemple Ras, COX-2, Src,  $\text{Ca}^{2+}$  et AP-1, et HIF-2a. Ces voies peuvent être cellule-spécifique (MIZUKAMI *et al.*, 2006, PAGES et POUYSSÉGUR, 2005, XIE *et al.*, 2004).

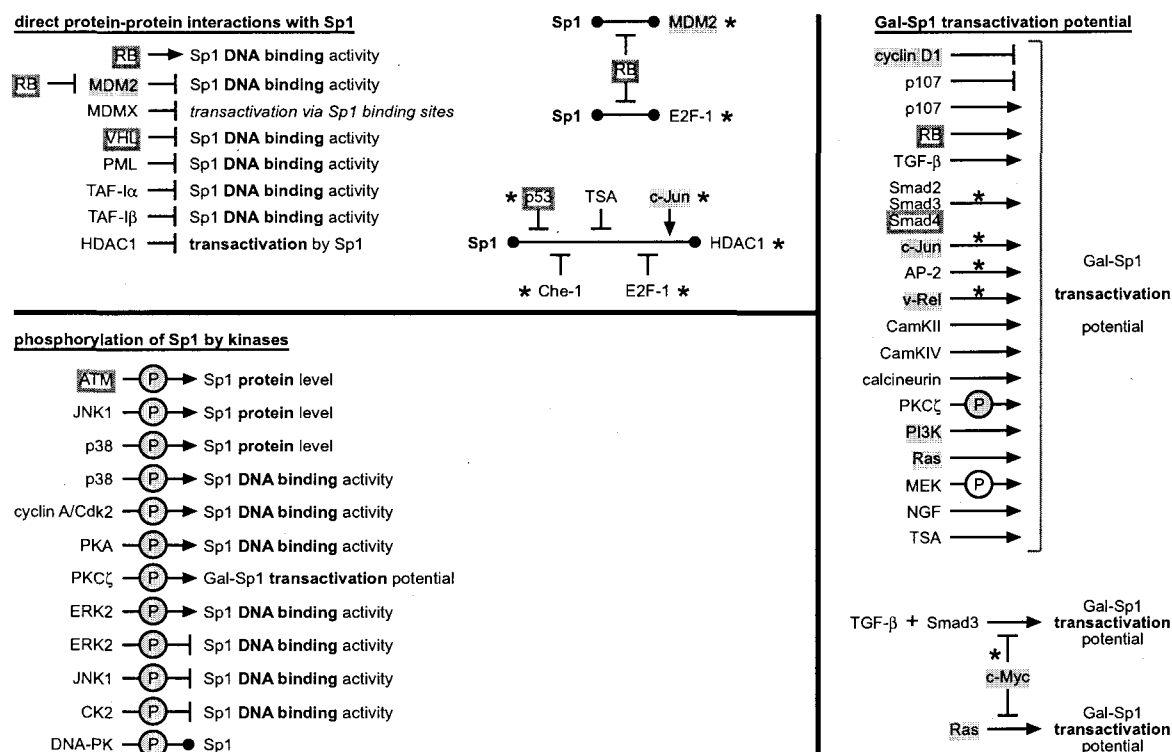
#### 3.4.2.1.2. Régulation en normoxie

Plusieurs modifications post-traductionnelles de HIF-1 (ou certaines des enzymes vu ci-haut) peuvent agir sur la stabilité et l'activité de HIF-1 $\alpha$  même en normoxie (BRAHIMI-HORN *et al.*, 2005, LEE *et al.*, 2004). Par exemple, dans certaines situations la MAPK Erk 1/2 est capable de phosphoryler HIF-1 $\alpha$ , d'augmenter son activité transcriptionnelle et l'expression de VEGF (RICHARD *et al.*, 1999). Certains co-activateurs de HIF-1 peuvent également être phosphorylés par l'activation de Erk (ex : CBP/p300) et augmenter l'activité transcriptionnelle de HIF-1 (SANG *et al.*, 2003). De plus, l'activation de certaines voies de signalisation peut agir sur la synthèse de HIF-1 $\alpha$  d'une façon à surpasser sa dégradation en normoxie (LEE *et al.*, 2004). Par exemple, certains médiateurs (ex : ROS) menant à l'activation de la voie PI3K/Akt et de Ras/MAPK/MEK peuvent augmenter l'expression de HIF-1 $\alpha$  (XIE *et al.*, 2004). Dans le cas du VEGF, il a d'ailleurs été montré à plusieurs reprises que la modulation du VEGF implique la voie PI3K/AKT agissant ensuite sur HIF-1 au niveau de sa stabilité, de son activation ou de sa synthèse en normoxie (JIANG *et al.*, 2000, LAUGHNER *et al.*, 2001, WOODS *et al.*, 2002, ZHONG *et al.*, 2000, ZUNDEL *et al.*, 2000). Le HIF-1 n'est donc pas seulement un joueur important en situation d'hypoxie pour la régulation du VEGF; il existe des situations en normoxie où la modulation du VEGF est aussi «HIF-1-dépendante».

#### 3.4.2.2. Sp1

Le facteur de transcription «specificity protein 1», un membre de la famille Sp/KLF, est exprimé de façon ubiquitaire, forme des homo-oligomères et possède trois domaines «C2H2-type zinc

fingers» adjacents pour lier les séquences consensus GC-boxes de l'ADN. Il peut aussi lier des CT-boxes et GT-boxes mais avec une plus faible affinité. La famille de Sp1 inclut Sp1-4 (avec N-TAD) et Sp5-9 (sans N-TAD). Ceux liant les GC-boxes avec le plus d'affinité et qui semblent être les plus importants sont Sp1 et Sp3. En fait, Sp1 et Sp3 démontrent une affinité et spécificité très semblable pour les GC-boxes, CT-boxes et GT-boxes si bien qu'ils peuvent compétitionner l'un contre l'autre pour les sites disponibles. Selon le contexte cellulaire et l'architecture du promoteur (ex : le nombre de GC-boxes), Sp3 peut coopérer, supprimer ou remplacer l'activité de Sp1. C'est le ratio Sp1:Sp3 qui devient alors parfois très important dans la régulation génique. La protéine Sp1 (sans autres partenaires) active l'activité transcriptionnelle de différents gènes de plusieurs façons: en liant un site Sp1 (GC, CT, GT-boxes) unique, par synergie en liant deux ou plusieurs sites Sp1 sans coopération dans la liaison à l'ADN ou en «superactivant» l'activité (liaison d'un Sp1 à un Sp1 déjà lié à l'ADN pour augmenter son activité). Dans certains contextes, Sp1 peut également être un répresseur de la transcription en recrutant des déacétylases (ex : HDAC1) ou des co-répresseurs. Fait intéressant, le facteur Sp1 a la capacité de recruter des protéines comme la TBP et TFIID. Il peut donc initier la transcription de gènes sans boîte TATA comme le VEGF-A. Autrefois (largement dû à son expression ubiquitaire), le Sp1 était considéré presque uniquement comme un activateur constitutif des «housekeeping genes» et d'autres gènes sans boîte TATA. Bref, des gènes souvent sans grande régulation et variation d'expression. Aujourd'hui, ce n'est plus le cas parce que nous savons que Sp1 est impliqué dans l'expression inductible de différents gènes (ex : VEGF-A) face à divers stimuli, le contrôle de la prolifération cellulaire et la tumorigenèse. En effet, l'activité transcriptionnelle de Sp1 peut être régulée par des modifications post-traductionnelles et des interactions avec d'autres protéines (ex : facteurs de transcription, oncogènes, suppresseurs de tumeurs) (voir Figure 9). L'effet final de Sp1 est très variable et dépend fortement du contexte cellulaire (WIERSTRA, 2008).



**Figure 9 : Modulation de l'activité de Sp1 (WIERSTRA, 2008)**

#### 3.4.2.2.1. Modifications post-traductionnelles

Les modifications post-traductionnelles de Sp1 sont par exemple la phosphorylation, l'acétylation, la glycosylation, l'ubiquitylation, la sumoylation et la poly(ADP-ribosylation). Ces modifications peuvent jouer sur le niveau de protéine Sp1 présent, l'activité transcriptionnelle et la capacité de liaison à l'ADN de Sp1. Un grand nombre de kinases peuvent agir sur Sp1 dans différents contextes (parfois de multiples façons) (CHU et FERRO, 2005, WIERSTRA, 2008). Par exemple, JNK1 et p38 peuvent directement phosphoryler Sp1 et augmenter son niveau tandis que p38, PKA, ERK1/2, JNK1 peuvent phosphoryler Sp1 et augmenter sa capacité de liaison à l'ADN. PKCζ peut lier Sp1, le phosphoryler et augmenter son activité transcriptionnelle. D'une façon directe ou indirecte, les protéines TGF-β, Smads 2,3,4, AP-2, v-Rel, PI3K, Ras et MEK1/2 peuvent également tous augmenter l'activité transcriptionnelle de Sp1 par modification post-transcriptionnelle (WIERSTRA, 2008). Dans le contexte de la modulation du VEGF, la

phosphorylation de Sp1 sur ses résidus thréonines 453 et 739 par ERK1/2 activé par la voie Ras-Raf a été démontré comme augmentant sa capacité de liaison à l'ADN et activant la transcription du VEGF-A dans des fibroblastes (MILANINI *et al.*, 1998, MILANINI-MONGIAT *et al.*, 2002). Dans des myocytes cardiaque de rat, l'interleukine 1b induit l'expression du VEGF-A d'une façon Sp-1 dépendant via l'activation de JNK et p38 (TANAKA *et al.*, 2000). Au niveau des kératinocytes, le HGF est capable d'augmenter la transcription du VEGF-A en activant entre autre la PI3K, ERK1/2 et la PKC $\zeta$  qui peuvent tous phosphoryler Sp1 pour augmenter sa capacité de transcription (REISINGER *et al.*, 2003). De plus, PKC $\zeta$  activé par PI3K et/ou Ras a déjà été montré comme étant capable de lier et de phosphoryler Sp1 pour augmenter son activité transcriptionnelle et l'expression de VEGF-A dans des cellules de fibrosarcome et de carcinome rénale (PAL *et al.*, 1998, PAL *et al.*, 2001). Dans des cellules cancéreuses cérébrales ou de la prostate, l'expression inductible de VEGF-A HIF-indépendant a été montré comme nécessitant la PI3K/AKT pour phosphoryler Sp1 (PORE *et al.*, 2004). Chez les cellules musculaires lisses pulmonaires, PGE<sub>2</sub> est capable d'induire le VEGF via l'activation de la voie camp/PKA pour phosphoryler Sp1 (BRADBURY *et al.*, 2005). Bien d'autres études démontrent que Sp1 peut être modifié pour l'induction de l'expression du VEGF-A comme par exemple chez les cellules de carcinomes bronchoalvéolaires par l'acide rétinoïque (MAENO *et al.*, 2002), chez les cellules de glioblastome via le TNF- $\alpha$  (RYUTO *et al.*, 1996) et chez les cellules NIH3T3 par le PDGF (FINKENZELLER *et al.*, 1997).

#### 3.4.2.2.2. Interactions avec d'autres protéines

Un nombre impressionnant d'interactions entre Sp1 et d'autres facteurs de transcriptions ont été décrits. Parmi ces facteurs, certains requièrent une liaison directe avec Sp1 tandis que d'autres semblent interagir d'une façon indirecte avec lui. Les facteurs de transcription peuvent agir en synergie avec Sp1 en liant l'ADN d'une façon coopérative ou en augmentant la capacité de

recrutement de la machinerie basale de transcription. De plus, certains facteurs de transcription peuvent agir par «superactivation» (voir Tableau 2) en liant des Sp1 déjà liés à l'ADN mais sans eux-mêmes lier leur site. Aussi, certains facteurs peuvent agir de plusieurs façons comme par exemple en étant à la fois un superactivateur et un facteur de synergie (WIERSTRA, 2008). Quelques exemples de synergie sont Sp1 et AP-1 (c-jun/c-fos; Sp1 lie c-jun) pour le gène CD11c (NOTI *et al.*, 1996), AP-2 et Sp1 pour le gène AM (ZHANG *et al.*, 2008) et Smad 3-4 et Sp1 pour le gène  $\alpha 2(1)$  collagène (ZHANG *et al.*, 2000). Pour ce qui est de la superactivation, notons particulièrement c-jun pour le gène p21, vimentine et pour des constructions reporteur gal4-binding site (KARDASSIS *et al.*, 1999, WU *et al.*, 2003). Finalement, certains oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs peuvent lier Sp1 pour modifier ses effets. Par exemple, l'oncogène MDM2 bloque la liaison de Sp1 à l'ADN tandis que Rb relâche MDM2 de Sp1, et les gènes suppresseurs de tumeurs pVHL et p53 empêchent la liaison de Sp1 à l'ADN (WIERSTRA, 2008).

**Tableau 2 : Superactivateurs de Sp1 (WIERSTRA, 2008)**

Superactivation of Sp1-mediated transactivation by	Target gene		Direct interaction of Sp1 with	References
c-Jun	p21 vimentin		c-Jun	[150,151]
Smad2 + Smad3 + Smad4	p21		Smad3, Smad4	[53,142,144]
AP-2	KiSS-1 CYP11A1	metastin, kisspeptin cholesterol side chain cleavage cytochrome P450 <sub>SCC</sub>	AP-2	[146,147]
VDR <sup>a</sup>	p27		VDR	[273-275]
Sp1	SV40 early	simian virus 40 early transcription unit	Sp1	[9,10]
c-Jun	reporter construct with GAL4-binding sites	superactivation of GAL4-Sp1	c-Jun	[150]
Smad2 + Smad3 + Smad4	reporter construct with GAL4-binding sites	superactivation of GAL4-Sp1	Smad2, Smad3, Smad4	[142,144]
AP-2	reporter construct with GAL4-binding sites	superactivation of GAL4-Sp1	AP-2	[146]
E2F-1	DHFR promoter with point-mutated E2F-binding sites	superactivation of Sp1	E2F-1	[246]
GATA-1	GATA-1-binding site immediately upstream of a TATA-box	superactivation of Sp1	GATA-1	[251]

### 3.4.2.3. AP-1

L'«activator protein-1 (AP-1) fait partie des «dimeric basic region-leucine zipper (bZIP) protein» comprenant les protéines Jun, Fos, «activating transcription factor (ATF)» et JDP. Le

complexe AP-1 peut être un homodimère ou un hétérodimère incluant différentes combinaisons de ces protéines. Comme tous les facteurs de transcription bZIP, la dimérisation est nécessaire avant de se lier à l'ADN (HESS *et al.*, 2004). Les séquences d'ADN que AP-1 lie sont les TPA response element (TRE; TGAC/GTCA) et dans une moindre mesure, les séquences CRE (camp response element) (SHAULIAN et KARIN, 2001). La majeure partie du temps, les membres de AP-1 sont constitutivement liés à l'ADN et leurs partenaires d'interactions doivent transloquer au noyau pour médier leurs effets (ERIKSSON, 2005). AP-1 est impliqué dans beaucoup de processus cellulaire comme par exemple la prolifération, la différenciation, l'oncogenèse, l'apoptose, l'angiogenèse et il médie la régulation génique en réponse à de nombreux stimuli physiologique ou pathologique comme les cytokines, les facteurs de croissances, les signaux de stress, les bactéries, les virus etc.... (ERIKSSON, 2005, SHAULIAN et KARIN, 2001). Sa régulation peut avoir lieu à différents niveaux; le niveau d'expression de ses sous-unités (Jun, Fos, ATF, JDP), les modifications post-traductionnelles de ses sous-unités et la composition du dimère (HESS *et al.*, 2004). En effet, la composition du dimère a été montré comme jouant un rôle dans la régulation de gènes cibles de AP-1, comme par exemple c-jun/c-fos qui active plus fortement le promoteur de la collagénase que c-jun/Fra-2 (BAKIRI *et al.*, 2002). Le rôle de AP-1 dans la régulation de VEGF est multiple. Par exemple, AP-1 peut être activé par des stimuli comme EGF, PDGF et bFGF pour ensuite induire la transcription du VEGF. En présence de ces stimuli, AP-1 est particulièrement activé par les PKCs ou les MAPK. En plus, AP-1 peut être activé par l'hypoxie, le stress oxydatif, l'acidose, les rayons UV et d'autres cytokines pour induire la transcription du VEGF (XIE *et al.*, 2004).

#### 3.4.2.3.1. Jun

La protéine c-jun est un «immediate-early gene» sans introns contenant un domaine bZIP pour la dimérisation, un domaine BD (basic région) pour la liaison à l'ADN, un domaine de



transactivation (TAD) et un delta-domain pour la liaison à la MAPK JNK. C-jun peut former des homodimères ou des hétérodimères avec d'autres Jun ou les protéines Fos et ATF. Par contre, les homodimères Jun-Jun sont moins stables que les hétérodimères Jun-Fos. La régulation de c-jun peut se faire par l'augmentation de son expression, mais c'est sa phosphorylation (S63, 73 et T91, 93 du TAD) qui est le joueur majeur en augmentant son activité transcriptionnelle et/ou en stabilisant la protéine. L'ubiquitination de c-fos (dans le domaine delta) pour sa dégradation par le protéasome est également possible, tout comme la sumoylation pour sa stabilité et activité. En plus de la phosphorylation, l'activation de c-jun requière aussi une déphosphorylation d'au moins un des groupes phosphates inhibiteurs en C-terminal (T231, 239 et S243, 249) pour permettre la liaison à l'ADN. D'autres protéines Jun existent comme JunB et JunD. Ces protéines sont semblables dans leur structure mais diffèrent beaucoup dans leur capacité d'activer la transcription (ERIKSSON, 2005).

#### 3.4.2.3.2. Fos

La protéine c-fos est aussi un «immediate-early gene» contenant les domaines bZIP, BD et TAD mais par rapport à c-jun, il contient un domaine DEF pour la liaison à la MAPK Erk. Contrairement à c-jun, c-fos ne peut pas former d'homodimère; il doit former des hétérodimères avec Jun ou ATF pour lier l'ADN. Même si l'ARNm et la protéine c-fos sont extrêmement instables, son mécanisme de régulation principal est l'augmentation de sa synthèse par différents stimuli. Cependant, son activité transcriptionnelle et sa stabilité peuvent également être augmentées par phosphorylation (ex : T232, 325. 331 et S362,374). Les autres protéines de la famille de Fos sont FosB, Fra-1 et Fra-2 (ERIKSSON, 2005).

#### 3.4.2.4. Autres

Bien d'autres facteurs de transcription sont impliqués dans la régulation du VEGF comme par exemple Stat3, AP-2 et Smad3. Dans certain cas, il est nécessaire d'avoir une activation et

coopération entre différents facteurs de transcription ou voies de signalisation pour une synthèse optimale de l'ARNm du VEGF-A (PAGES et POUYSSEGUR, 2005, XIE *et al.*, 2004). Par exemple, en cas d'hypoxie (DAMERT *et al.*, 1997) ou de stimulation par NO (KIMURA *et al.*, 2000), la synthèse du VEGF-A est augmentée avec la coopération entre HIF-1 et AP-1. AP-1 peut aussi coopérer avec Sp1 pour l'induction du VEGF après stimulation aux rayons UVB (BLAUDSCHUN *et al.*, 2002). De plus, il est parfois nécessaire d'avoir une coopération entre Sp1 et AP-2 pour une induction maximale de VEGF par la voie de la p42/p44 MAPK (MILANINI *et al.*, 1998).

### 3.4.3 Régulation post-transcriptionnelle

Même si la régulation transcriptionnelle est de loin le mécanisme le plus important, la régulation post-transcriptionnelle a un rôle bien établie. C'est via la région 3'UTR (et possiblement 5'UTR) que la demi-vie de l'ARNm du VEGF-A peut être augmentée. Ces régions contiennent des éléments de déstabilisation de l'ARNm. Une façon connue d'augmenter la demi-vie de l'ARNm du VEGF-A est via la liaison d'une protéine nommé HuR dans des régions de stabilité riche en bases AU de la région 3'UTR. HuR est principalement localisée dans le noyau et lorsqu'elle lie l'ARNm elle le stabilise et réduit sa dégradation par les endonucléases (XIE *et al.*, 2004, YOO *et al.*, 2006). Cette protéine a d'ailleurs été montrée comme étant surexprimée dans de nombreux types de tumeurs cérébrales (SAKUMA *et al.*, 2008) et étant induite par l'hypoxie, un facteur connu pour augmenter la stabilité de l'ARNm du VEGF-A (LEVY *et al.*, 1998). D'autre part, la protéine PAIP2 (Poly(A)-binding protein-interactin protein 2) a aussi été montrée comme étant capable d'augmenter la demi-vie de l'ARNm du VEGF-A en liant sa région 3'UTR et en interagissant avec HuR (ONESTO *et al.*, 2004). Fait intéressant, la demi-vie de l'ARNm en normoxie est d'environ 30 à 60 minutes (<1h), ce qui est de beaucoup inférieur à la moyenne des ARNm des eucaryotes en normoxie qui se situe environ à 10h (YOO *et al.*, 2006).

#### 3.4.4. Régulation de la traduction

Normalement, la traduction chez les eucaryotes commence grâce à la coiffe 5' terminale 7-méthylguanosine des ARNm étant donné qu'elle est reconnue par les facteurs d'initiation eucaryotique de la traduction (les eIFs). Ces facteurs forment un complexe d'initiation recrutant la petite sous-unité ribosomale pour «scanner» la région 5'UTR à la recherche d'un codon «start» et finalement recruter la grosse sous-unité ribosomale (ALGIRE et LORSCH, 2006). La région 5'UTR de l'ARNm du VEGF-A, très longue (environ 1000 pb contrairement à une moyenne de 300 pb pour les ARNm eucaryotes typiques) et riche en GC, contient cependant une structure secondaire importante pour la régulation de la traduction : internal ribosome entry site (IRES) (XIE *et al.*, 2004, YOO *et al.*, 2006). L'IRES est une séquence de nucléotide formant une structure qui permet l'initiation de la traduction d'une façon «coiffe-indépendante» et sans «scanning» en recrutant soit les ribosomes directement au codon start ou avec l'aide de facteurs comme les ITAFs (IRES trans-acting factors). Jusqu'à maintenant, on sait que les IRES sont présents sur  $\geq 90$  ARNm des eucaryotes souvent impliqués dans la réponse au stress, à la survie/apoptose et à la mitose (HELLEN et SARNOW, 2001). En fait, le VEGF-A contient deux IRES fonctionnels dans sa région 5'UTR et ils sont importants pour le maintien de la production de la protéine même dans des conditions réduisant l'efficacité de l'initiation de la traduction «classique» comme par exemple l'hypoxie (XIE *et al.*, 2004, YOO *et al.*, 2006). D'autres mécanismes régulant la traduction du VEGF-A existent, notons particulièrement la protéine ORP150. Cette protéine est notamment induite par l'hypoxie et sert de chaperonne dans le réticulum endoplasmique pour le repliement et «trafficking» de protéines nouvellement synthétisées. Elle a été démontrée comme étant nécessaire à la sécrétion du VEGF autant en normoxie qu'en hypoxie (XIE *et al.*, 2004).

### **3.5 Implication du VEGF dans l'angiogenèse du remodelage**

Plusieurs médiateurs sont probablement responsables de l'augmentation de l'angiogenèse dans le remodelage des voies respiratoires, mais le plus probable est le VEGF (vascular endothelial growth factor) (CHETTA *et al.*, 2007, WALTERS *et al.*, 2008). Plusieurs études abondent d'ailleurs dans ce sens. En effet, chez des enfants asthmatiques en crise ou en rémission, le niveau de VEGF dans leurs expectorations induites est plus élevé que les enfants contrôles et il a une corrélation positive avec la sévérité de l'asthme et une corrélation inverse avec le FEV<sub>1</sub>. Après 6 semaines de thérapie par corticostéroïde, les niveau de VEGF diminuent mais n'atteignent pas les niveaux contrôles (ABDEL-RAHMAN *et al.*, 2006, HOSSNY *et al.*, 2009). Chez des patients asthmatiques adultes le ratio de VEGF/endostatine des expectorations induites est plus élevé que les contrôles (ASAI *et al.*, 2002). De plus, le niveaux de VEGF des expectorations induites est élevé et il y a une corrélation positive avec le degré d'obstruction et de perméabilité vasculaire (ASAI *et al.*, 2003). Par ailleurs, les patients asthmatiques ont des niveaux élevés de VEGF dans les bronches et dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire, et présentent des bourgeons d'angiogenèse au niveau de leurs voies aériennes. Il y avait aussi une corrélation positive entre le marquage du VEGF et le nombre de vaisseaux sanguins par mm<sup>2</sup> (FELTIS *et al.*, 2006, HOSHINO *et al.*, 2001). Dans une autre étude, le nombre de cellules positives à l'ARNm de VEGF, VEGFR1 et VEGFR2 était plus élevé chez les asthmatiques et il y avait une corrélation positive avec le degré de vascularité, le degré d'obstruction d'hyper-réactivité bronchique (HOSHINO *et al.*, 2001). Récemment, deux études du même groupe ont montré que le liquide de lavage bronchoalvéolaire de patients asthmatiques avait une activité angiogénique *in vitro* via le VEGF (SIMCOCK *et al.*, 2007), et que les cellules musculaires lisses de patients asthmatiques (mais pas celles des patients contrôles) induisaient l'angiogenèse *in vitro* via la sécrétion de VEGF (SIMCOCK *et al.*, 2008).

## 2. AVANT PROPOS DE L'ARTICLE

Les expériences présentées dans l'article suivant intitulé « LTD<sub>4</sub> Induces VEGF Factor Production in Monocytes and Bronchial Smooth Muscle Cells Through CysLT1 Receptor Signaling » ont été majoritairement effectuées par Sébastien Poulin. Les co-auteurs ayant participé aux travaux sont Charles Thompson et Stéphanie McMahon. L'écriture de l'article a été effectuée par Sébastien Poulin sous la supervision du Dr. Rola-Pleszczynski. Dr. Claire M. Dubois et Dr. Jana Stankova ont également participé à l'élaboration du texte. Cet article sera soumis au *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* en août 2009.

**AUTORISATION D'INTÉGRATION  
D'UN ARTICLE ÉCRIT EN COLLABORATION  
À UN MÉMOIRE OU UNE THÈSE**

Je (ou nous), soussignée(s), soussigné(s), co-auteure(s), co-auteur(s) de l'article intitulé : LTD4 Induces VEGF production in Monocytes and Branchial Smooth Muscle Cells Through CysLT1 Receptor Signaling

reconnais (reconnaissons) que ledit article sera inclus comme partie constituante du mémoire ☒ de la thèse ☐

de l'étudiant(e) (nom) : Sébastien Poulin

inscrit(e) au programme de Immunologie

de la Faculté de Médecine et Sciences de la Santé de l'Université de Sherbrooke

En foi de quoi, j'ai (nous avons) signé cet engagement en un nombre suffisant d'exemplaires\*

Signature Stephanie McMahon Date : 23 juillet 2009  
Nom Stephanie McMahon  
Coordonnées 975 chemin Capellen, Canton Hatley,  
JOB 2C0

Signature Marek Rola-Pleszczyński Date : 23/07/09  
Nom Marek Rola-Pleszczyński  
Coordonnées 3001, 12<sup>e</sup> Avenue N  
Sherbrooke, QC J1H 5N4

Signature Jana Stankova Date : 23/07/09  
Nom Jana Stankova  
Coordonnées 3001, 12<sup>e</sup> Ave N  
Sherbrooke, QC J1H 5N4

Signature Claire Dubois Date : 23 juillet 2009  
Nom CLAIRE DUBOIS  
Coordonnées 3001, 12<sup>e</sup> avenue Nord  
Sherbrooke, QC, J1H 5N4

\* Un exemplaire pour l'étudiante, l'étudiant, un exemplaire pour chaque personne signataire et un exemplaire pour le Service des bibliothèques (à remettre avec le mémoire ou la thèse au moment du dépôt final).

**AUTORISATION D'INTÉGRATION  
D'UN ARTICLE ÉCRIT EN COLLABORATION  
À UN MÉMOIRE OU UNE THÈSE**

Je (ou nous), soussignée(s), soussigné(s), co-auteure(s), co-auteur(s) de l'article intitulé : LTD $\alpha$  Induces  
VEGF production in Monocytes and Bronchial Smooth Muscle  
Cells Through CysLT $\alpha$  Receptor Signaling

reconnais (reconnaissons) que ledit article sera inclus comme partie constituante du mémoire ☒ de la thèse ☐

de l'étudiant(e) (nom) : Sébastien Poulin

inscrit(e) au programme de Immunologie

de la Faculté de Médecine et Sciences de la Santé de l'Université de Sherbrooke

En foi de quoi, j'ai (nous avons) signé cet engagement en un nombre suffisant d'exemplaires\*

Signature

Nom

Coordonnées

[Signature]  
Charles Thompson

Date :

27/08/2008

610 App#1 Av de Norvège  
Québec Qc G1X 3E8

Signature

Nom

Coordonnées

Date :

Signature

Nom

Coordonnées

Date :

Signature

Nom

Coordonnées

Date :

\* Un exemplaire pour l'étudiante, l'étudiant, un exemplaire pour chaque personne signataire et un exemplaire pour le Service des bibliothèques (à remettre avec le mémoire ou la thèse au moment du dépôt final).

### 3- RÉSUMÉ DE L'ARTICLE

L'auteur principal de l'article « LTD<sub>4</sub> Induces VEGF Factor Production in Monocytes and Bronchial Smooth Muscle Cells Through CysLT1 Receptor Signaling » est Sébastien Poulin. Il a planifié et exécuté la grande majorité des expériences. Il a également effectué la majorité de l'écriture de l'article sous la supervision de Dr. Rola-Pleszczynski.

Résumé : Puisque les cysteinyl-leucotriènes auraient un rôle majeur à jouer dans le remodelage des voies respiratoires dans l'asthme, nous avons investigué le potentiel de ceux-ci à moduler l'expression du VEGF, un facteur de croissance impliqué dans un des processus du remodelage, c'est-à-dire l'angiogenèse. Nous avons démontré que LTD<sub>4</sub> induisait la production du VEGF chez les monocytes et les cellules musculaires lisses bronchiques humaines d'une façon dépendante du récepteur CysLT1. La stimulation des cellules HEK-293 exprimant de façon stable CysLT1 avec des cysLTs a montré une activation du promoteur du VEGF d'une façon dépendante de la concentration ainsi qu'une augmentation de l'ARNm et de la protéine du VEGF d'une façon dépendante du temps de stimulation. Des mutations réduisant la liaison de HIF-1 à ses sites n'ont pas empêché la transactivation du promoteur du VEGF par les cysLTs. De plus, des délétions en 5' du promoteur du VEGF ont montré que la partie proximale contenant 1 site AP-1 et 4 sites Sp1 était nécessaire pour sa régulation par les cysLTs. Des pré-traitements avec des inhibiteurs pharmacologiques de JNK et ERK, mais pas p38, et une surexpression des formes dominantes négatives de c-Jun, c-Fos et Ras ont suggéré l'implication des MAPKs et du complexe AP-1 dans l'activation du promoteur du VEGF par les cysLTs. Par contre, la mutation du site AP-1 n'a pas prévenu la transactivation, suggérant que le complexe AP-1 n'agirait pas directement sur le promoteur. Ensuite, nous avons observé une inhibition de l'activation du promoteur du VEGF et de la synthèse d'ARNm de VEGF par LTD<sub>4</sub> en utilisant un inhibiteur de la transcription dépendante de Sp1, la mithramycine. Les mutations des sites Sp1 dans la



promoteur du VEGF ont également mené à l'inhibition de sa transactivation par LTD<sub>4</sub>. Bref, nos résultats indiquent pour la première fois que les cysLTs peuvent induire la production du VEGF d'une façon dépendante de la transcription avec l'implication de JNK, ERK, le complexe AP-1 et Sp1. Ces résultats suggèrent donc que les cysLTs pourraient être importants dans le processus angiogénique du remodelage des voies respiratoires et indiquent un bénéfice potentiel jusqu'à maintenant inconnu dans l'utilisation des antagonistes des récepteurs CysLT1 dans la prévention ou traitement du remodelage dans l'asthme.

#### 4- ARTICLE

### **LTD<sub>4</sub> Induces VEGF Production in Monocytes and Bronchial Smooth Muscle Cells Through CysLT<sub>1</sub> Receptor Signaling<sup>1</sup>**

Sébastien Poulin, Charles Thompson, Stéphanie McMahon, Claire M. Dubois, Jana Stankova,  
Marek Rola-Pleszczynski<sup>2</sup>

*Running title:* LTD<sub>4</sub>-induced VEGF expression

Immunology Division, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine and Health Sciences,  
Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada

Corresponding author: Marek Rola-Pleszczynski  
Immunology Division  
Department of Pediatrics  
Faculty of Medicine and Health Sciences  
Université de Sherbrooke

## Abstract

Cysteinyl leukotrienes (cysLTs) are suggested to be implicated in the process of airway remodeling in asthma. We investigated the potential for cysLTs to modulate VEGF expression, a growth factor involved in the angiogenesis of airway remodeling. We found that LTD<sub>4</sub> induction of VEGF in human monocytes and bronchial smooth muscle cells is CysLT1 dependent. Stimulation of HEK-293 cells stably expressing CysLT1 with cysLTs showed a concentration-dependent activation of the VEGF promoter and a time-dependent increase in VEGF mRNA and protein. Mutations of HIF-1 sites failed to reduce cysLT-induced VEGF promoter activation and 5' deletions showed that the proximal region containing one AP-1 and four Sp1 sites was necessary. Pretreatment with inhibitors of JNK and ERK, but not p38, and overexpression of dominant negative forms of c-Jun, c-Fos or Ras suggested the implication of MAPKs and AP-1. Mutation of the AP-1 binding element failed to prevent VEGF transactivation suggesting that AP-1 might not act directly on the promoter. Moreover, inhibition of Sp1-dependent transcription by mithramycin completely inhibited VEGF promoter transactivation and VEGF mRNA expression by LTD<sub>4</sub>. Finally, mutations of Sp1 binding elements prevented VEGF promoter transactivation. Our data indicate for the first time that cysLTs can transcriptionally activate VEGF production via CysLT1 receptors, with involvement of JNK, ERK, the AP-1 complex and Sp1. These findings suggest that cysLTs may be important in the angiogenic process of airway remodeling and potentially provide a previously unknown benefit of using CysLT1 receptor antagonists in the prevention or treatment of airway remodeling in asthma.

*Keywords:* Cysteinyl-leukotriene, angiogenesis, airway remodeling, AP-1, Sp1

## Introduction

Cysteinyl-leukotrienes (cysLTs), which comprise leukotriene (LT)<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, and LTE<sub>4</sub>, are potent eicosanoids well known to be involved in the pathogenesis of asthma and the resulting pulmonary inflammation(1). Interestingly, higher levels of these lipid mediators have been found in severe forms of asthma(2, 3). CysLTs are mainly released by eosinophils, mast cells and macrophages in the airways (4). They act on at least two G-protein-coupled receptors, CysLT<sub>1</sub> and CysLT<sub>2</sub>(5), but have recently been reported to also activate the orphan receptor GPR17(6). Whereas CysLT<sub>2</sub> is widely distributed, CysLT<sub>1</sub> is mainly expressed in leukocytes, some epithelial cells and bronchial smooth muscle cells (7). Several studies suggest that cysLTs may also play a role as protagonists of airway remodeling in asthma, which is characterized by different processes including fibrogenesis, bronchial smooth muscle cell (BSMC) proliferation, reticular basement membrane thickening and myofibroblast proliferation (8, 9). Indeed, we and others have previously shown that cysLTs may contribute to human BSMC proliferation (10-12). Recently, we also showed their involvement in the transcriptional up-regulation of the proprotein convertase furin, an enzyme implicated in bioactivation of several fibrogenic/angiogenic factors leading to airway remodeling (13). Interestingly, Henderson and colleagues demonstrated that a specific CysLT<sub>1</sub> antagonist could reduce (14) or even reverse (15) some established parameters of airway remodeling in a murine asthma model.

Airway remodeling in asthma also involves an increase in angiogenesis, a process most likely to be mediated by several angiogenic mediators including vascular endothelial growth factor (VEGF)(16). Previous studies have shown a positive correlation between VEGF levels in induced sputum in asthmatics, the level of vascularisation and the severity

of asthma (17, 18). Simcock and colleagues also demonstrated that bronchoalveolar lavage fluid (BALF) from asthmatic patients (19) or cell-free supernatants from BSMC (20) of asthmatics have increased levels of angiogenic activity mediated by VEGF. VEGF-A, or simply VEGF, is the most potent angiogenic mediator known and is the prototypical member of the VEGF family, which comprises 7 different members. It is a homodimeric protein with at least 7 different splice variants. Beside different levels of bioavailability and the fact that the isoform 165 is the most biologically active form, little is known about differences between the variants (21). In the lungs, VEGF is mostly expressed by alveolar macrophages, eosinophils, mast cells, T lymphocytes, BSMC, fibroblasts and epithelial cells (22, 23). Beside asthma and airway remodeling, VEGF is also important for other types of angiogenesis, as for example in wound healing, pregnancy, psoriasis, rheumatoid arthritis and colorectal cancer (24). Importantly, in a study with lung-targeted VEGF165 transgenic mice, Lee and colleagues showed that VEGF induced an asthma-like phenotype with Th2-inflammation, parenchymal and vascular remodeling and airway hyper-responsiveness (25). VEGF also enhanced Th2-mediated sensitization to respiratory antigens and increased the number of activated DC2 dendritic cells.

Regulation of VEGF expression can occur at the gene transcription, translation and post-translational levels. However, transcriptional regulation has been the most studied because genetic/epigenetic factors and extracellular stimuli mostly act on this level (26). The transcription of the VEGF gene is complex and is regulated by an impressive number of response elements within its promoter region. Some important ones being hypoxia response elements (HRE), and elements for AP-1, Sp1 and Stat3 (26-28). This fine regulation is cell-type dependant, depends on the microenvironment present (ex: normoxia vs hypoxia) and/or the presence of a myriad of different stimuli possibilities including

growth factors, cytokines and lipid mediators like PGE1, PGE2 and prostacyclin(27).

Moreover, the VEGF transcriptional regulation is complicated by the interplay between different regulatory regions as for example the synergy between AP-1 binding domain and HIF-1 binding domain in hypoxic conditions(28).

Even though cysLTs increase angiogenesis both in vitro (29) and in vivo (30), little is known about the influence of cysLTs on the production of angiogenesis factors. Two studies showed that CysLT1 antagonists lead to diminished airway levels of VEGF in both murine asthma models (31) and asthmatic patients (32). Recently, a study also showed that a CysLT1 antagonist administrated jointly with cyclosporine A (CsA) prevented CsA-induced nephrotoxicity in a rat model by reducing TGF- $\beta$  and VEGF levels (33).

From the proposed relationship between cysLTs, airway remodeling and angiogenesis as well as the relationship between VEGF and vascular remodeling in asthmatic airways, we hypothesized that cysLTs could modulate the expression of VEGF. In the present report, we demonstrate for the first time that cysLTs can indeed upregulate the expression of VEGF mRNA and protein in human monocytes and BSMC. In addition, using HEK-293 cells stably transfected with the CysLT1 receptor, as a model to study CysLT1 signaling, we show that modulation of VEGF expression through CysLT1 is transcriptional and involves the activation of JNK, ERK, the AP-1 complex and Sp1 in a HIF-1-independent manner.

## Materials and methods

### *Reagents*

LTC<sub>4</sub> and LTD<sub>4</sub> were obtained from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). Puromycin was from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada), and hygromycin B (Wisent, St-Bruno, Qc, Canada) and FuGENE6 were purchased from Roche (Laval, Qc, Canada). Montelukast (MK-476) was obtained from Merck Frosst (Pointe-Claire, PQ, Canada). MEK-1 inhibitor PD98059, p38 inhibitor SB203580 and Sp1-dependent transcription inhibitor Mithramycin-A were all purchased from Biomol Research Laboratory (Plymouth Meeting, PA, USA). SP600125 (c-Jun kinase [JNK] inhibitor II) was from Calbiochem (San Diego, CA, USA). IL-13 was obtained from R&D, Minneapolis, MN, USA)

### *Plasmids*

The human VEGF promoter luciferase constructs VEGF-WT-2.3kB, its 5' deletion mutants (VEGF-WT-1.9kB, VEGF-WT-1.5kB, VEGF-WT-1.0kB) and its HRE mutants (VEGF-HRE $\Delta$ 306, VEGF-HRE $\Delta$ 975) were generously provided by Dr. Daniel C. Chung (Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts, USA) and were previously described [34]. All of these constructs were in pGL2-basic vector from Promega (Madison, WI, USA). The dominant negative constructs of the protein Jun (A-JunD) and Fos (A-FosB) were generously provided by Dr. Charles Vinson (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) and were in CMV500 vector. The dominant negative of Ras (RasN17) was in M2N vector. The CMV-Luc-ODD construct was kindly provided by Dr Richard K. Bruick

(University of Texas, Austin, TX). The HRE-tk-LUC has been previously described (35, 36). The VEGF-WT-123 bp construct, its VEGF- $\Delta$ 4xSp1 mutant (both in PGL2-basic vector) and the pGL2-4xSp1-TK-luc, previously described(37), were generously provided by Dr. Xianjun Fang (Virginia Commonwealth University School of Medicine, Richmond, VA).

### *Cells*

Human monocytes were derived from human peripheral blood mononuclear leukocytes obtained from normal donors after informed consent in accordance with an Internal Review Board-approved protocol as previously described (38). Monocytes were cultured in RPMI 1640 medium (Life technologies, Burlington, ON, Canada) with 10% heat-inactivated FBS (Sigma-Aldrich). Human primary BSMCs (BioWhittaker Inc., Walkersville, MD, USA) were derived from a 5- week-old black male, free of pre-existing lung disease. Culture procedures have previously been described (11) and all experiments with BSMC were performed with cells at the fourth passage. HEK293 cells (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA) stably transfected with either CysLT1, CysLT2 or PAF receptor were generated in our laboratory, as previously described (39, 40), and are referred here as HEKLT1, HEKLT2 or HEKPAFR respectively. HEKLT1 and HEKLT2 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium with glucose (Invitrogen-Gibco, Carlsbad, CA, USA), supplemented with 10% heat-inactivated FBS and 100 U/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin (Sigma-Aldrich). Receptor-expressing clones were maintained with hygromycin B (100  $\mu$ g/ml) or puromycin (10  $\mu$ g/ml), respectively. Cell clones of HEKLT1 and HEKLT2 were analyzed using FACScan flow cytometer (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) before the experiments and consistently showed



approximately 75% surface receptor expression. Untransfected or empty vector-transfected HEK293 cells expressed neither CysLT1 nor CysLT2 receptors. Transient transfections were performed with FuGENE 6 and experiments were performed 48 h after transfection.

### *Site-directed mutagenesis*

The AP-1 sequence located at position +419 bp within the VEGF-WT-2.3 kB promoter was mutated using PCR mutagenesis with mutagenic primers (forward : 5-AGC GAC AGG GGC AAA GTT AGT TAC CTG CTT TTG GGG GTG A-3, and reverse : 5-CAC CCC CAA AAG CAG GTA ACT AAC TTT GCC CCT GTC GCT T-3) and flanking primers (forward : 5-ATG GGT AAT TTT CAG GCT GTG-3, and reverse : 5-CCC AGA AGT TGG ACG AAA AGT T-3). Distinct mutations were generated by replacing TGAGTGA → TAAGTAA which has been shown to lose AP-1 binding ability in a previous study(41). Mutations were verified by direct sequencing. This plasmid is referred to as VEGF-ΔAP-1.

### *Luciferase Assays*

HEKLT1 or HEKLT2 cells were plated in 12-well tissue culture plates 24 h before transfection and transiently transfected using 1.5 µL of FuGENE 6 transfection reagent (Roche Diagnostics Canada) and 0.5 µg of plasmid DNA per well according to the manufacturer's instructions. The day after transfection, cells were serum-starved overnight before pretreatment for the desired time with different inhibitors or vehicle, then stimulated with LTC<sub>4</sub> or LTD<sub>4</sub> at different concentrations or equivalent vehicle

(ethanol ;EtOH) concentration for the indicated time. Cell lysates were assayed for luciferase activity (using the Dual-Glo luciferase system from Promega) which was normalized for basal activity of promoter-less plasmid.

### *ELISA*

HEKLT1 or HEKLT2 cells were cultured and stimulated in 6-well culture plates, monocytes were distributed and stimulated in 12 mL tubes and BSMCs were cultured and stimulated in 6-well culture plates. All were serum-starved overnight before stimulation with LTC<sub>4</sub> or LTD<sub>4</sub> at 10 nM or equivalent vehicle (EtOH) concentration for indicated times. Culture supernatants were carefully collected, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C. VEGF concentrations were determined using the Quantikine Human VEGF Immunoassay kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

### *Real-Time PCR*

In selected experiments, HEKLT1, HEKLT2, BSMCs or monocytes were pretreated or not with different inhibitors or vehicle, then stimulated with 10 nM LTC<sub>4</sub> or LTD<sub>4</sub> for the indicated times. Total RNA was purified using Trizol reagent (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions and 1.0 µg of RNA was converted to cDNA with oligo dT (Amersham Biosciences) and reverse transcriptase (M-MLV) from Promega in a volume of 20 µl. VEGF and GAPDH (as a housekeeping gene) expression were measured using real-time PCR performed on a Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Kirkland, PQ, Canada). The following oligonucleotide primer sets were used. Human VEGF:

forward, 5-AAT CGA GAC CCT GGT GGA-3 and reverse 5-ATC TGC ATG GTG ATG TTG GA-3; human GAPDH: forward, 5-GAT GAC ATC AAG AAG GTG GTG AA-3 and reverse, 5-GTC TTA CTC CTT GGA GGC CAT GT-3. The primer set designed for VEGF was for VEGF-A, without distinction between the different splice variants. Each sample for the real-time PCR consisted of: 1 µl of 1/10 dilution cDNA in water, 0.8 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs (Roche), 10 pmol of each primers, 2 µl of TAQ 10x buffer, 0.5 units of TAQ polymerase (New England Biolabs, Pickering, ON, Canada), and 0.66 µl of SYBR Green (1/1,000 stock dilution ; Cedarlan Laboratories, Burlington, ON, Canada) in a reaction volume of 25 µl. The cycling program for both genes consisted of an initial denaturation at 95°C for 5 minutes then 40 cycles of amplification conditions as follows: 95°C (30 s), 60°C (30 s), 72°C (30 s), and a final extension at 72°C for 6 minutes. The melting procedure was as follows : 72°C for 5 sec then 1°C increase each 30 sec up to 99°C. Comparison of the expression of each gene between its control and stimulated states was determined with the delta-delta ( $\Delta\Delta$ )Ct method, according to the following formula: ( $\Delta\Delta$ Ct = [(Ct G.O.I<sub>ctl</sub> - Ct H.K.G<sub>ctl</sub>) - (Ct G.O.I<sub>stim</sub> - Ct H.K.G<sub>stim</sub>)]). Results were then transformed into fold variation measurements: fold increase =  $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ .

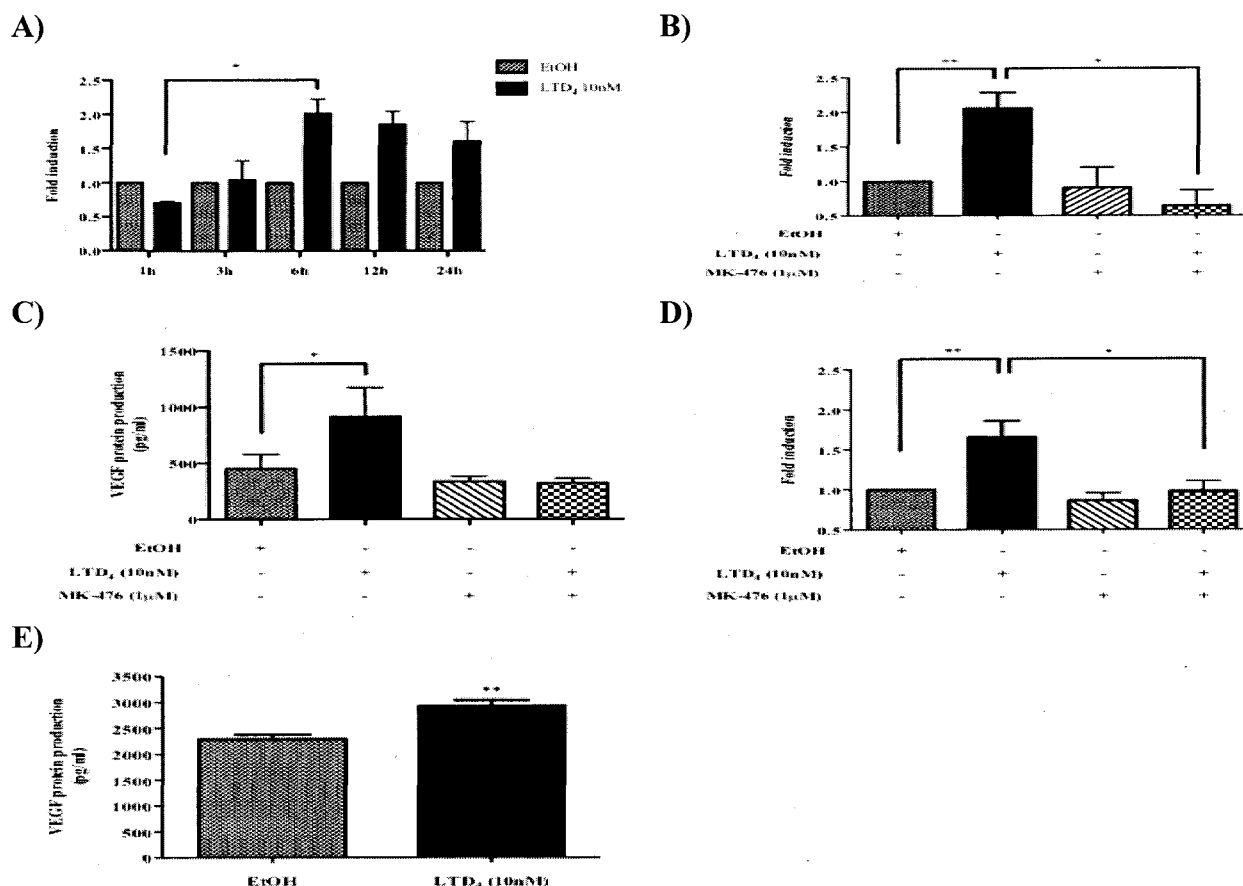
### *Statistical Analyses*

Where mentioned, statistical significance was determined using the Student's t test for paired data (one-tailed) or one-way ANOVA, as appropriate, using PRISM4 software (GraphPad Software Inc, San Diego CA). Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## Results

### *CysLTs increase VEGF expression in monocytes and BSMCs*

Since airway remodeling in asthma is a process involving both inflammatory and structural cells of the respiratory tract (42), we first tested the hypothesis that cysLTs can modulate the expression of VEGF in monocytes and BSMCs. Both of these cell types express the CysLT receptors. More precisely, monocytes equally express CysLT1 and CysLT2 whereas BSMCs express more CysLT1 than CysLT2 (7). Time-course experiments were conducted at a chosen concentration of 10 nM LTD<sub>4</sub> because of the known EC<sub>50</sub> of LTD<sub>4</sub> in different cell types (1). Figure 1A shows the kinetics of VEGF mRNA expression in monocytes following LTD<sub>4</sub> stimulation, as measured by real-time PCR. Results indicate a two-fold increase in VEGF mRNA expression starting at 6 h, which appears to be maintained for up to 24 h of stimulation. When monocytes were pretreated with a specific antagonist of CysLT1 receptor, MK-476 (Montelukast), before a 12h stimulation, the increase in VEGF mRNA expression was totally prevented (Figure 1B), suggesting that this effect was CysLT1 receptor-dependent. As shown in Figure 1C, not only was the VEGF mRNA expression increased, but, as expected, the level of VEGF protein accumulation within culture supernatants was significantly increased after 24h of stimulation and was totally blocked by MK-476 pretreatment. As for the BSMCs, a 1.7-fold increase of VEGF mRNA expression was seen after 12h of LTD<sub>4</sub> stimulation that could be totally blocked by pretreatment with MK-476 (Figure 1D), indicating that the process was also CysLT1 receptor-dependent in BSMCs. VEGF protein levels were also significantly increased in BSMCs at 24h of stimulation (Figure 1E), as in monocytes, although to a lesser degree. BSMCs were initially pretreated 24h with IL-13 to increase CysLT1 receptor level at the surface as previously shown (11). In brief, the results indicate that VEGF expression can be induced by cysLTs at both the mRNA and protein levels.



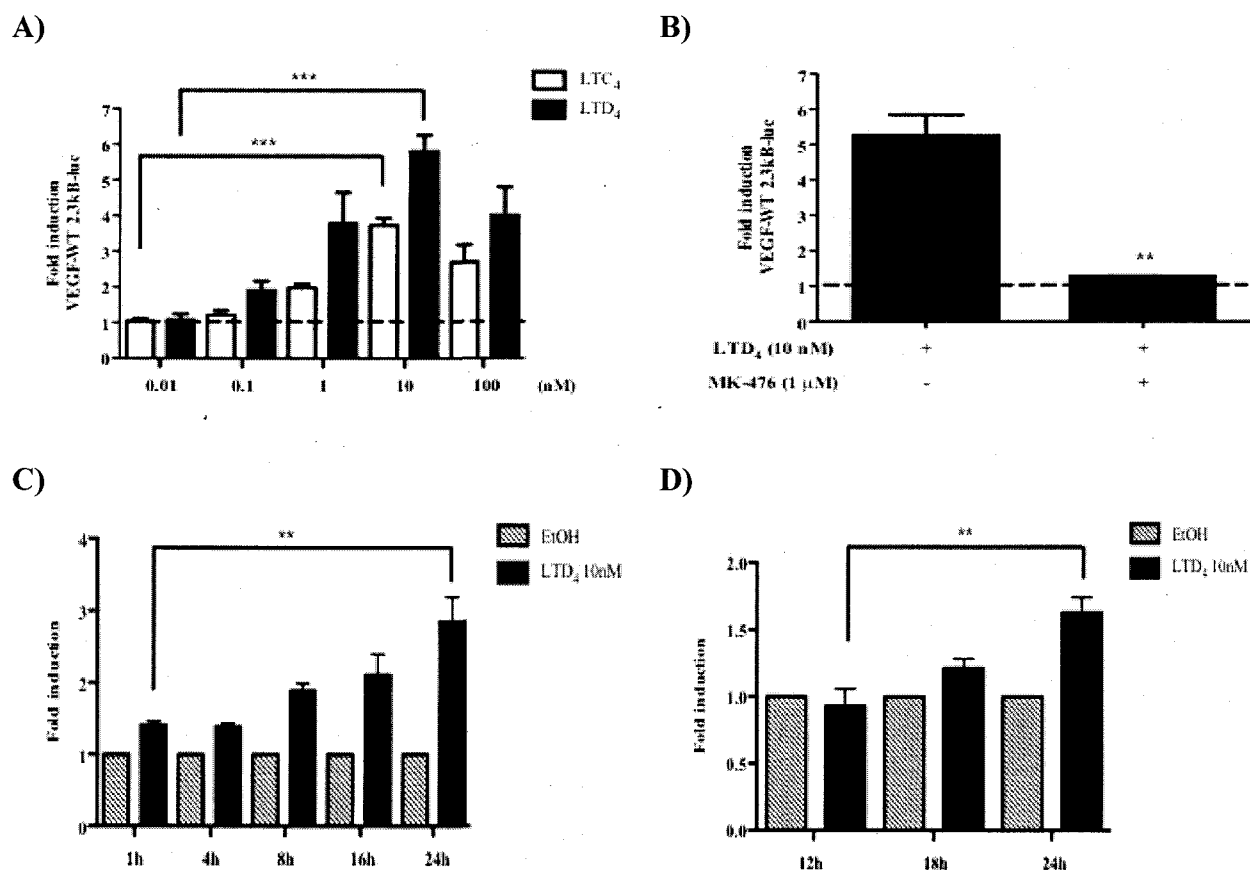
**Figure 1 : CysLTs increase VEGF expression in monocytes and BSMCs.**

**A.** Monocytes were treated with LTD<sub>4</sub> (10 nM) or EtOH for the indicated times. Quantification of VEGF mRNA levels was performed by real-time PCR. Data are expressed as –fold increase relative to the housekeeping gene GAPDH. (n=3) **B.** Monocytes were pretreated or not with 1 μM of MK-476 for 30 min and were then stimulated with LTD<sub>4</sub> (10 nM) or EtOH for 12h. Quantifications were performed as in A. (n=3) **C.** Monocytes were pretreated or not with 1 μM of MK-476 for 30 min and were then stimulated with LTD<sub>4</sub> (10 nM) or EtOH for 24h. Supernatants were collected to measure VEGF protein by ELISA. (n=5) **D.** Human bronchial smooth muscles cells (BSMCs) were pretreated for 24h with IL-13 and were then pretreated or not with 1 μM of MK-476 for 30 min before stimulation with LTD<sub>4</sub> (10 nM) or EtOH for 12h. Quantification of VEGF mRNA levels was performed by real-time PCR. Quantifications were performed as in A. (n=5) **E.** hBSMCs were pretreated for 24h with IL-13 before stimulation with EtOH or LTD<sub>4</sub> (10 nM) for 24h and supernatants were collected to measure VEGF protein by ELISA. (n=3)

Data are expressed as mean ± S.E.M

*CysLTs increase VEGF expression in HEKLT1 cells*

VEGF transcription is driven by a well characterized 2.362 kB (28) promoter region and, since we observed an increase in VEGF mRNA expression, we investigated whether cysLTs act at the transcriptional level, using a luciferase reporter gene construct driven by the VEGF-WT-2.3 kB promoter. In order to dissect selective receptor-mediated mechanisms of VEGF modulation, we used the HEK293 cell line stably expressing only the CysLT1 receptor, referred to as HEKLT1 cells, as previously described (40). As shown in Figure 2A, there was a concentration-dependent transactivation of the VEGF promoter with a maximal effect at 10 nM of LTC<sub>4</sub> (4-fold) and LTD<sub>4</sub> (6-fold). The LTD<sub>4</sub> response was stronger than the LTC<sub>4</sub> response, with an equivalent promoter transactivation at a 10-fold lower concentration. Moreover, VEGF promoter transactivation by 10nM LTD<sub>4</sub> was completely blocked following a pretreatment with MK-476 (Figure 2B). VEGF mRNA and protein production was also increased by LTD<sub>4</sub>. As seen in Figure 2C, VEGF mRNA expression started to increase at 8h (~2 fold) and reached a statistically significant increase (~ 3 fold) at 24h. LTD<sub>4</sub> also increased VEGF protein production in HEKLT1 cells with a small but significant increase at 24h (Figure 2D). VEGF promoter activity in response to cysLT stimulation was not induced in untransfected HEK293 cells (data not shown).



**Figure 2 : CysLTs increase VEGF expression in HEKLT1 cells**

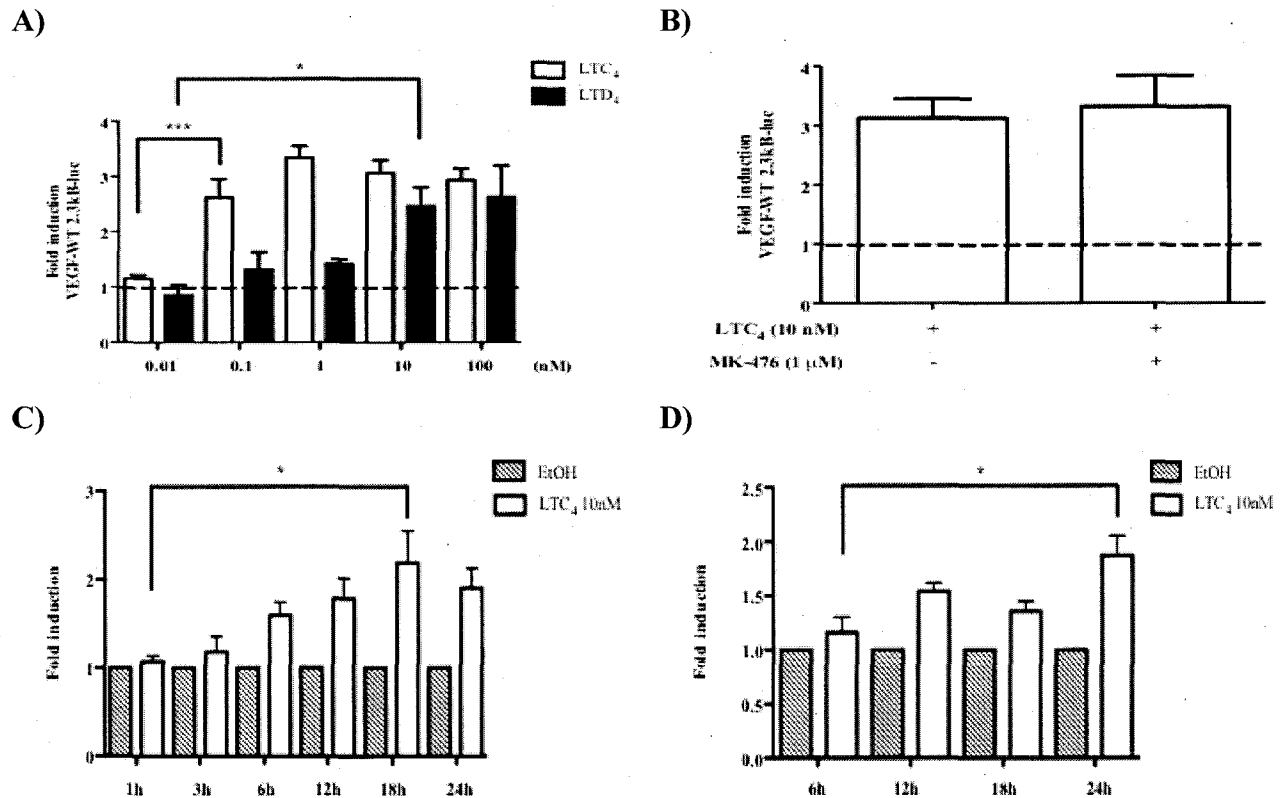
**A.** HEKLT1 cells were transiently transfected with 0,5  $\mu$ g/well of pGL2 (promoterless vector) or pVEGF-WT-2.3 kB promoter constructs. Cells were incubated for 8h with EtOH, LTC<sub>4</sub> or LTD<sub>4</sub> at indicated concentrations before measurement of luciferase activity. Data are expressed as –fold increase relative to EtOH control. (n=4) **B.** HEKLT1 cells were pretreated or not with 1 $\mu$ M of MK-476 for 30 min and were then stimulated with LTD<sub>4</sub> (10nM) or EtOH for 8h before measurement of luciferase activity. Data are expressed as –fold increase relative to EtOH control. (n=3) **C.** HEKLT1 cells were treated with LTD<sub>4</sub> (10nM) or EtOH for the indicated times. Quantification of VEGF mRNA levels was performed by real-time PCR. Data are expressed as –fold increased relative to the housekeeping gene GAPDH. (n=3) **D.** HEKLT1 cells were treated with LTD<sub>4</sub> (10nM) or EtOH for the indicated times and supernatants were collected to measure VEGF protein by ELISA. Data are expressed as –fold increase relative to EtOH control. (n=3)

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M

*CysLTs increase VEGF expression in HEKLT2 cells*

To further dissect selective receptor-mediated mechanisms of VEGF modulation, we repeated the same experiments as above with HEK293 cells stably expressing only the CysLT2 receptor (HEKLT2 cells), as previously described (39). As seen in Figure 3A, both LTC<sub>4</sub> and LTD<sub>4</sub> induced a concentration-dependent transactivation of the VEGF promoter after an 8h stimulation with a maximum 3-fold increase. Interestingly, the maximal effect of LTC<sub>4</sub> was at 1-10 nM whereas it was at a hundred-fold higher concentration for LTD<sub>4</sub> (10-100 nM). As expected, the addition of a CysLT1 specific antagonist did not block the transactivation of the VEGF promoter in HEKLT2 cells (Figure 3B). Furthermore, VEGF mRNA production started to increase at 6h (~1,5 fold) and reached a statistically significant increase (~ 2 fold) at 18h of stimulation with 10 nM LTC<sub>4</sub> (Figure 3C). Finally, LTC<sub>4</sub> also enhanced VEGF protein production in HEKLT2 cells with a significant increase at 24h (Figure 3D).





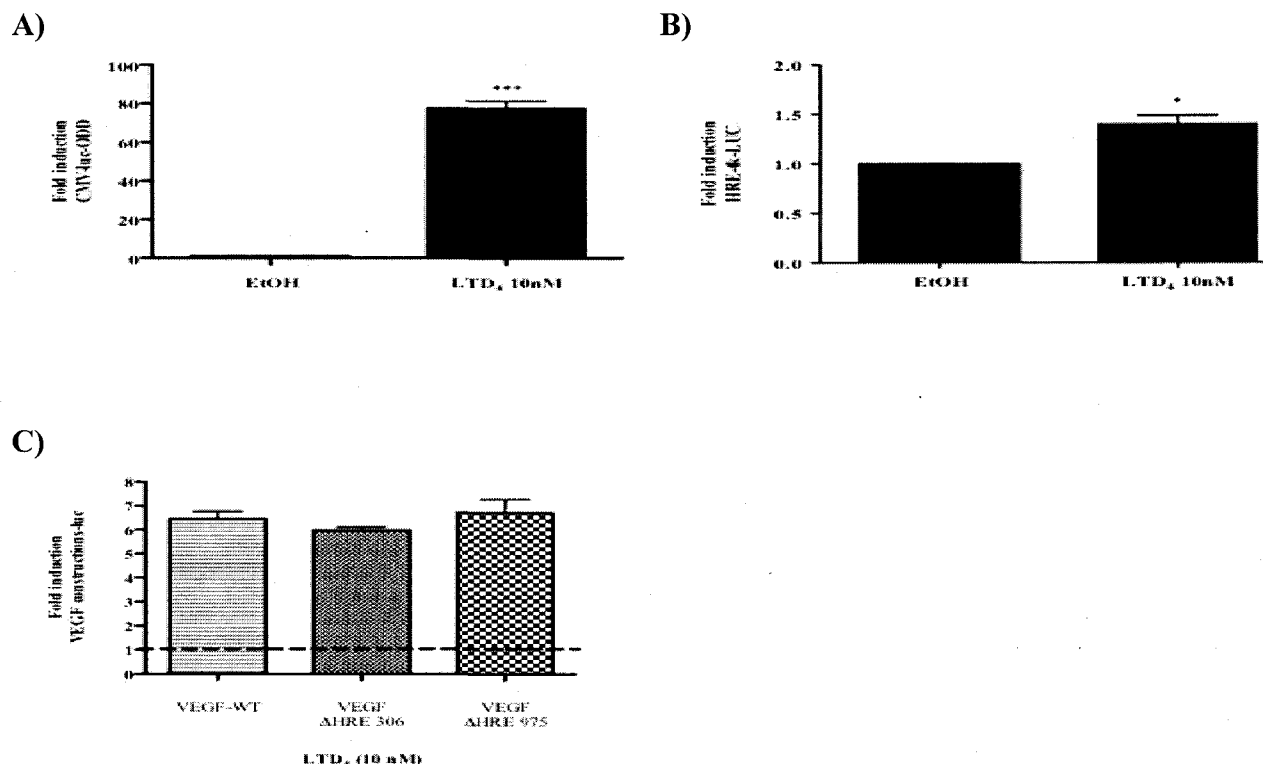
**Figure 3 : CysLTs increase VEGF expression in HEKLT2 cells**

**A.** HEKLT2 cells were transiently transfected with 0,5  $\mu$ g/well of pGL2 (promoterless vector) or pVEGF-WT-2.3 kB promoter constructs. Cells were incubated for 8h with EtOH or LTC<sub>4</sub> or LTD<sub>4</sub> at indicated concentrations before measurement of luciferase activity. Data are expressed as –fold increase relative to EtOH control. **B.** HEKLT2 cells were pretreated or not with 1  $\mu$ M of MK-476 for 30 min and were then stimulated with LTC<sub>4</sub> (10nM) or EtOH for 8h before measurement of luciferase activity. Data are expressed as –fold increase relative to EtOH control. **C.** HEKLT2 cells were treated with LTC<sub>4</sub> (10nM) or EtOH for the indicated times. Quantification of VEGF mRNA levels was performed by real-time PCR. Data are expressed as –fold increased relative to the housekeeping gene GAPDH. **D.** HEKLT2 cells were treated with LTC<sub>4</sub> (10nM) or EtOH for the indicated times and supernatants were collected to measure VEGF protein by ELISA. Data are expressed as –fold increase relative to EtOH control.

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M; n = 3

*CysLTs increase VEGF expression in a HIF-1-independent*

HIF-1 is not only implicated in the modulation of VEGF in hypoxia, but also in normoxia, via its possible induction, increased binding affinity or stabilization by different signaling pathways (26). To first test the possibility that cysLTs stimulation can stabilize the HIF-1 $\alpha$  protein in normoxia, we used a luciferase assay with a construction coding for the HIF-1 $\alpha$  ODD domain fused with the luciferase gene (CMV-Luc-ODD). Because the HIF-1 $\alpha$  ODD contains the key residues involved in HIF-1 $\alpha$  stabilization, such reporter system is used to assess HIF-1 $\alpha$  stability under various conditions (43). As observed in Figure 4A, there is an approximately 80-fold increase in luciferase activity after a 10 nM LTD $_4$  stimulation (compared to vehicle) in HEKLT1 cells. These findings indicated that LTD $_4$  could indeed stabilize HIF-1 $\alpha$ . Next we transfected HEKLT1 cells with a HRE-tk-LUC construction known to be responsive to HIF-1 (35, 36). As can be seen in Figure 4B, a small but significant increase in luciferase activity was observed after LTD $_4$  stimulation, indicating that HIF-1 $\alpha$  stabilization by LTD $_4$  was also functionally significant in our cell model. Finally, we used VEGF 2.3 kB promoters containing HRE mutations at position +306 or +975, that corresponds to the two HRE sites present in the VEGF promoter construct. Contrary to what was expected, no significant decrease in VEGF promoter activity was observed after LTD $_4$  stimulation using either of the mutant (Figure 4C).



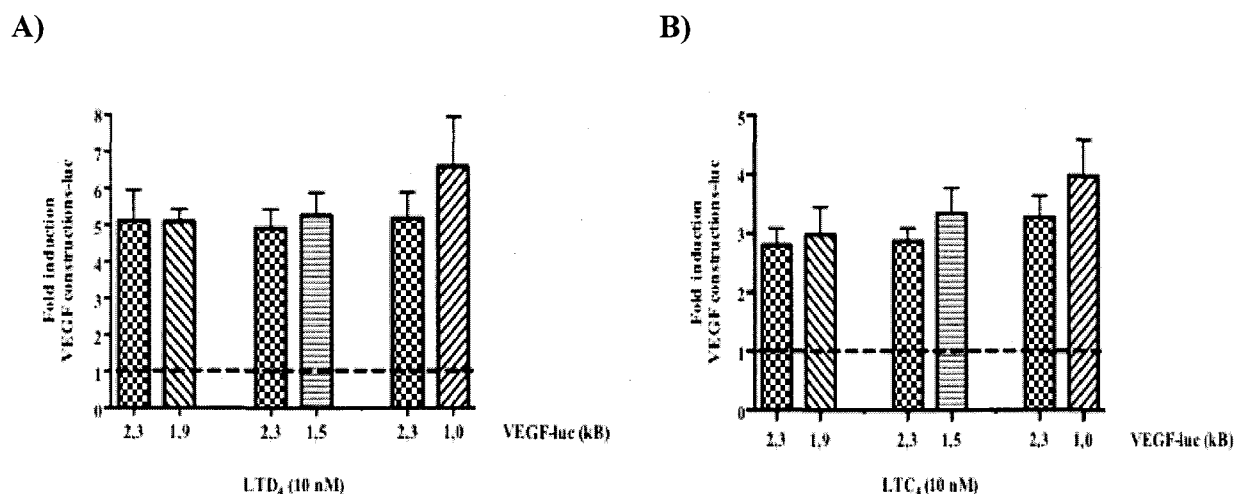
**Figure 4 : CysLTs increase VEGF expression in a HIF-1-independent way**

**A.** HEKLT1 cells were transiently transfected with 0,5 ug/well of CMV500 or CMV-luc-ODD promoter construct. Cells were incubated for 6h with EtOH or LTD<sub>4</sub> at 10nM before measurement of luciferase activity. Data are expressed as –fold increase relative to EtOH control. (n=4) **B.** HEKLT1 cells were transiently transfected with 0,5 ug/well of HRE-tk-LUC promoter construct. Cells were incubated for 6h with EtOH or LTD<sub>4</sub> at 10nM before measurement of luciferase activity. Data are expressed as –fold increase relative to EtOH control. (n=3) **C.** HEKLT1 cells were transiently transfected with 0,5 ug/well of pGL2 (promoterless vector) or pVEGF-WT-2.3 kB promoter constructs or its HRE mutants, namely VEGF-ΔHRE 306, VEGF-ΔHRE 975. Cells were incubated for 8h with EtOH or LTD<sub>4</sub> at 10nM before measurement of luciferase activity. Data are expressed as –fold increase relative to EtOH control. (n=3)

Data are expressed as mean ± S.E.M

*Promoter regions upstream of position -90pb in the VEGF promoter are not required for its transactivation by the cysLTs*

To define the region(s) of the VEGF promoter implicated in its transcriptional regulation by cysLTs, 5' deletion constructs of the VEGF-WT-2.3 kB promoter were tested. As observed in Figure 5A and 5B, VEGF promoter activity in either HEKLT1 or HEKLT2 cells stimulated for 8h with LTD<sub>4</sub> 10 nM or LTC<sub>4</sub> 10 nM, respectively, was statistically comparable using either VEGF-WT-1.9, VEGF-WT-1.5 or VEGF-WT-1.0 promoter constructs compared to the full length VEGF-WT-2.3 kB promoter. These results further suggest that the -306 and -975 HRE sites within the VEGF promoter are dispensable for LTD<sub>4</sub>-inducible expression. They also indicate that cysLTs responsiveness is located downstream of position -90 bp.



**Figure 5 : Consensus sequences upstream of position -90pb in the VEGF promoter are not required for its transactivation by the CysLTs in HEKLT1 or HEKLT2 cells**

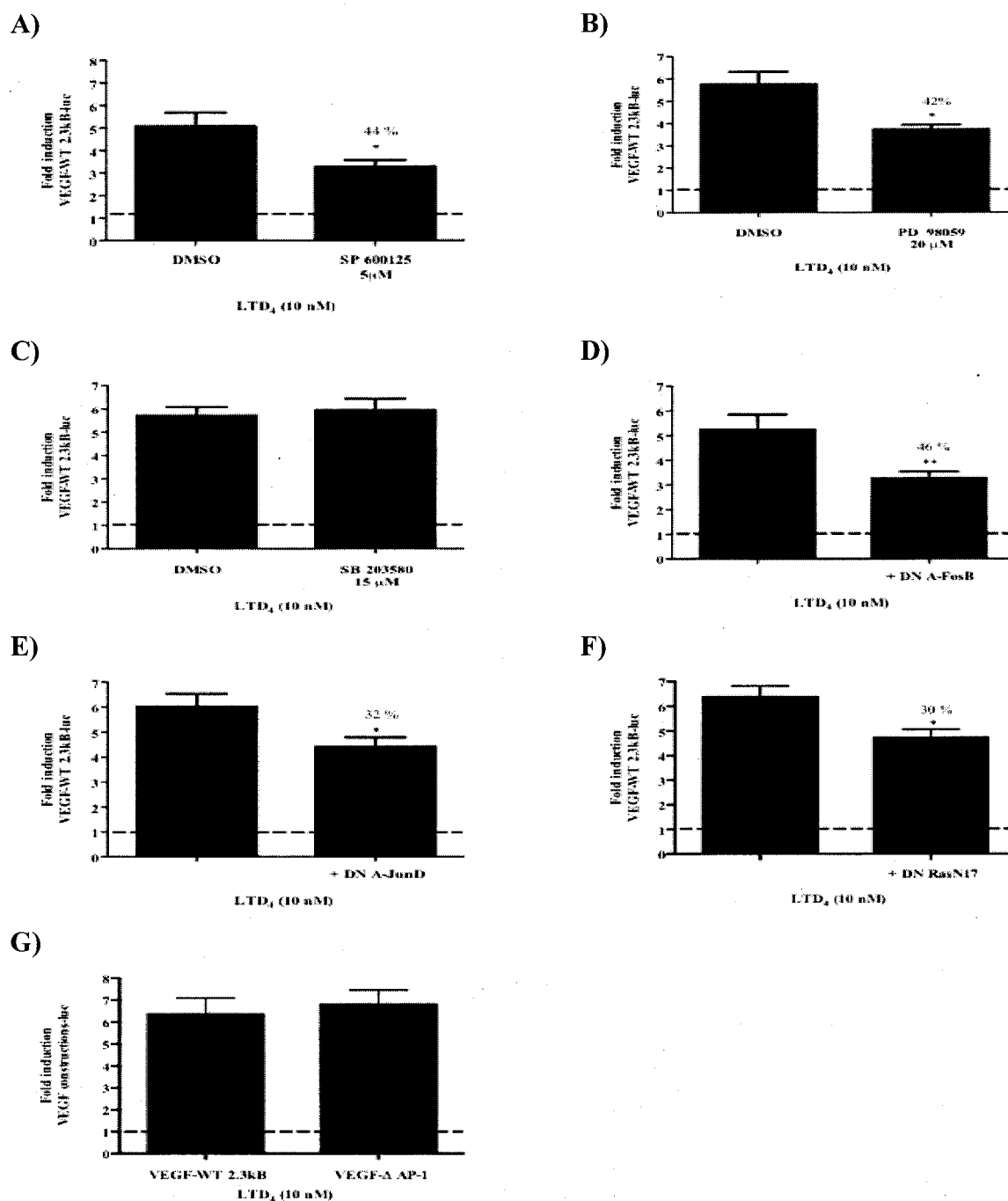
HEKLT1 (A) or HEKLT2 (B) cells were transiently transfected with 0,5 ug/well of pGL2 (promoterless vector) or pVEGF-WT-2.3 kB promoter constructs or its 5' deletion mutants, namely VEGF-WT-1.9 kB, VEGF-WT-1.5 kB and VEGF-WT-1.0 kB. Cells were incubated for 8h with EtOH or LTD<sub>4</sub> (or LTC<sub>4</sub>) at indicated concentrations before measurement of luciferase activity. Data are expressed as –fold increase relative to EtOH control.

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M; n = 3

*Implication of MAPK pathway in the transactivation of VEGF promoter in HEKLT1 cells.*

Computer-assisted analysis of the VEGF promoter region downstream of -90 bp indicated one AP-1 binding consensus sequence at position +419 bp located within the cryptic promoter of VEGF. CysLTs had previously been shown to activate the AP-1 complex via the MAPK pathway (39, 40) and VEGF is often modulated by the AP-1 complex in different cell types with several inflammatory stimuli including cytokines and hypoxia (26). We therefore investigated whether MAPKs and this AP-1 site were responsible for VEGF modulation by cysLTs. HEKLT1 cells transfected with the VEGF-WT-2.3 kB promoter were pretreated with different pharmacologic MAPK inhibitors and then stimulated with LTD<sub>4</sub> 10 nM. As shown in Figure 6A and Figure 6B, pretreatment with the inhibitors of JNK (SP 600125, 5uM) and MEK (PD 98059, 20 uM) reduced LTD<sub>4</sub>-induced VEGF promoter activation by 44% and 42%, respectively, suggesting that the MAPKs JNK and ERK1/2 (downstream of MEK) are most probably involved in the modulation of VEGF promoter activation by cysLTs. In contrast, the p38 inhibitor SB 203580 failed to induce any loss of promoter activity (Figure 6C). To further analyze the possible role of AP-1 in VEGF modulation by the cysLTs, we co-transfected HEKLT1 cells with dominant negative (DN) forms of FosB and JunD proteins. As illustrated in Figure 6D and Figure 6E, overexpression of each of the DN proteins, that act by binding their wild-type partners and inhibit DNA binding of the AP-1 complex, significantly reduced LTD<sub>4</sub>-induced VEGF promoter activation by 46% for DN-FosB and 32% for DN-JunD. Furthermore, co-transfection of HEKLT1 cells with dominant negative Ras, which is well known to block the activation of the AP-1 complex via the Ras/Raf/ERK pathway (44), reduced VEGF promoter activity by 30% (Figure 6F). Since all these data pointed toward the implication of the only AP-1 site available in the -90 truncated VEGF promoter, we introduced point mutations of that site (TGAGTGA → TAAGTAA), a strategy that had been shown in a previous study to inhibit AP-1 complex ligation (41). Surprisingly, the

mutant promoter failed to show any reduction in LTD<sub>4</sub>-induced VEGF promoter activation (Figure 6G).



**Figure 6 : Implication of MAPKs pathway in the transactivation of VEGF promoter in HEKLT1 cells.**

A, B, C. HEKLT1 cells were transiently transfected with 0,5  $\mu$ g/well of pGL2 (promoterless vector) or pVEGF-WT-2.3 kB promoter constructs. Cells were pretreated with either SP600125



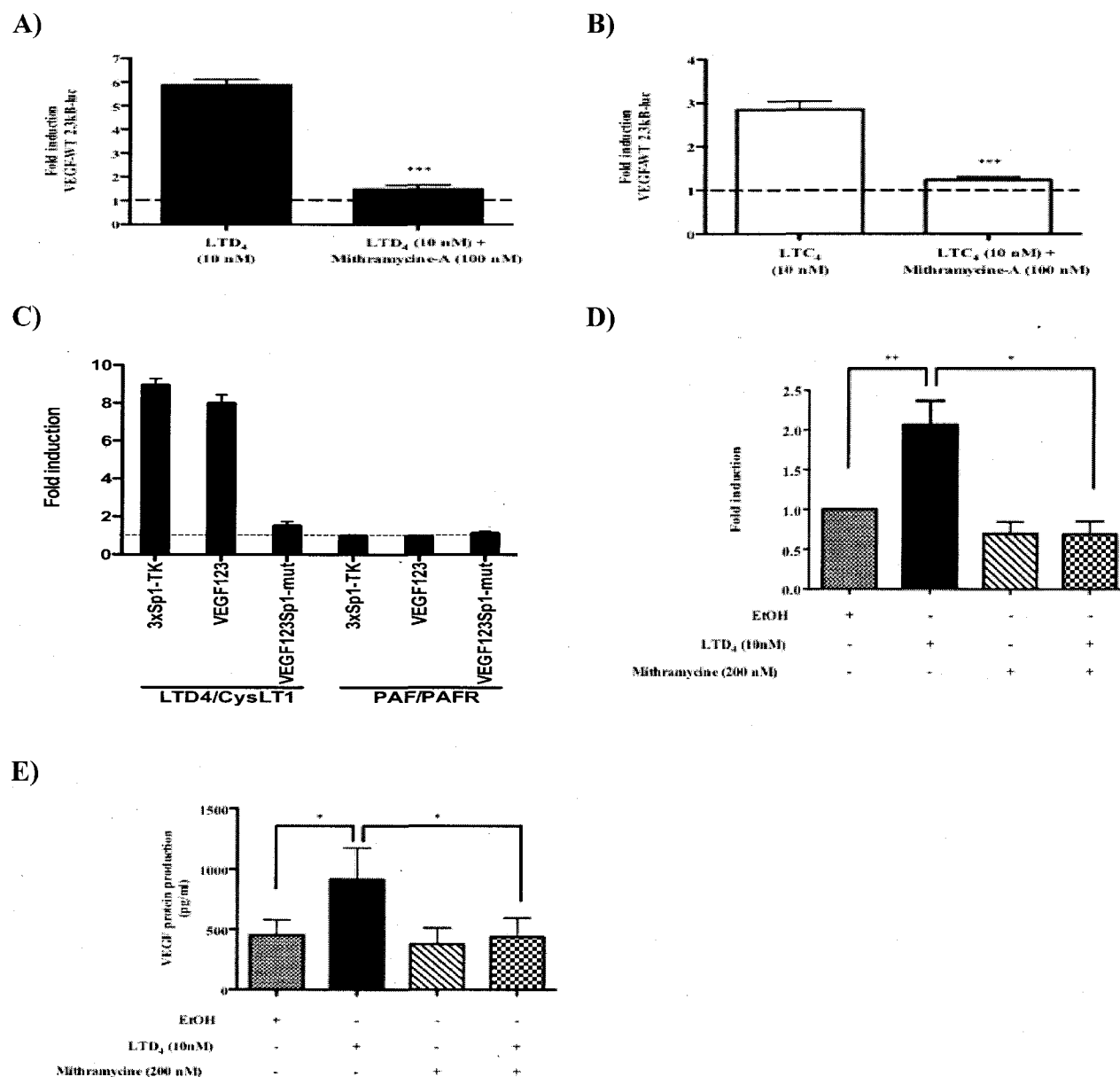
(5  $\mu$ M), PD98059 (20  $\mu$ M), SB203580 (15  $\mu$ M), or their control vehicle DMSO for 30 min. An 8h incubation with EtOH or LTD<sub>4</sub> (10 nM) was allowed before measurement of luciferase activity. Data are expressed as –fold increase relative to EtOH control. (n=5,4,6) **D, E, F.**

HEKLT1 cells were transiently transfected with 0,5  $\mu$ g/well of pVEGF-WT-2.3 kB and pcDNA3 or dominant negative A-FosB, A-JunD and RasN17 constructs. Cells were incubated for 8h with EtOH or LTD<sub>4</sub> (10 nM) before measurement of luciferase activity. Data are expressed as –fold increase relative to EtOH control. (n=8,4,4) **G.** HEKLT1 cells were transiently transfected with 0,5  $\mu$ g/well of pGL2 (promoterless vector), pVEGF-WT-2.3 kB or pVEGF- $\Delta$ AP-1 promoter constructs. Cells were incubated for 8h with EtOH or LTD<sub>4</sub> (10 nM) before measurement of luciferase activity. Data are expressed as –fold increase relative to EtOH control. (n=5)

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M

*Implication of the transcription factor Sp1 in the expression of VEGF by cysLTs.*

With the previous results demonstrating that the AP-1 sites in the VEGF promoter may not be implicated in its activation after all, we focused our attention on the SP1 transcription factor. Indeed, in the shortest (1.0 kB) 5' deletion mutant of the VEGF promoter, there are at least 5 Sp1 sites left, 4 of which are in a cluster just downstream of -90 bp. Even if there is no evidence of Sp1 activation by cysLTs in the literature at this time, there are many studies implicating Sp1 in the modulation of VEGF in different cell types and with different mediators (26). Therefore, we tested the hypothesis that cysLTs could activate the Sp1 transcription factor, which would result in the increase in VEGF expression. Mithramycine-A is a molecule often used and well known to inhibit Sp1-dependent transcription by binding to GC-rich region (45, 46) on DNA and therefore inhibiting its ligation with Sp1. As shown in Figure 7A and Figure 7B, Mithramycine-A (100 nM) completely inhibited the VEGF promoter activation in both HEKLT1 and HEKLT2 cells after an 8h stimulation with LTD<sub>4</sub> or LTC<sub>4</sub> 10 nM, respectively. Moreover, we showed that a pGL2-4xSp1-TK-luc construct could be transactivated after LTD<sub>4</sub> stimulation in HEKLT1 cells but not in HEK cells stably expressing PAF receptor (HEKPAFR cells). Then, using a VEGF promoter construct of 123 bp containing the cluster of 4 Sp1 binding elements or its 4xSp1 mutant version, we showed that the LTD<sub>4</sub> VEGF transactivation was completely prevented in CysLT1 cells when Sp1 sites were mutated whereas in HEKPAFR cells both constructions did not result in VEGF promoter transactivation (Figure 7C). Furthermore, mithramycine (200 nM) completely inhibited the increase in VEGF mRNA expression (Figure 7D) and VEGF protein levels (Figure 7E) in monocytes following a 12h LTD<sub>4</sub> (10nM) stimulation. These results suggest that Sp1 is the major transcription factor implicated in the modulation of VEGF expression by the cysLTs.



**Figure 7 : Implication of the transcription factor Sp1 in the expression of VEGF by the CysLTs.**

HEKLT1 (A) or HEKLT2 (B) cells were transiently transfected with 0,5 ug/well of pGL2 (promoterless vector) or pVEGF-WT-2.3 kB promoter constructs. Cells were pretreated or not for 24h with mithramycin-A (100 nM) and were treated for 8h with EtOH or LTD<sub>4</sub> (of LTC<sub>4</sub>) at 10 nM before measurement of luciferase activity. Data are expressed as –fold increase relative to EtOH control. (n=5,4) C. HEKLT1 or HEKPAFR cells were transiently transfected with 0,5

ug/well of pGL2-4xSp1-TK-luc, VEGF-WT-123 bp or VEGF- $\Delta$ 4xSp1 mutant constructs. Cells were incubated for 8h with EtOH or LTD<sub>4</sub> at 10 nM before measurement of luciferase activity. Data are expressed as –fold increase relative to EtOH control. (n=3) **D.** Monocytes were pretreated or not for 24h with mithramycine-A (200 nM) and then treated with EtOH or LTD<sub>4</sub> (10 nM) for 12h. Quantification of VEGF mRNA levels was performed by real-time PCR. Data are expressed as –fold increased relative to the housekeeping gene GAPDH. (n=3) **E.** Monocytes were pretreated or not for 24h with mithramycine-A (200 nM) and then treated with EtOH or LTD<sub>4</sub> (10 nM) for 24h. Supernatants were collected to measure VEGF protein by ELISA. (n=5)

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M

## Discussion

Angiogenesis is physiologically necessary but can also be pathological in different situations such as cancer, psoriasis, rheumatoid arthritis and atherosclerosis (24). Moreover, airway remodeling in chronic severe asthma is characterized by several processes including airway smooth muscle hyperplasia, fibrogenesis, reticular basement membrane thickening, myofibroblast proliferation and an increase in angiogenesis (8, 9). Among the possible mediators implicated in the angiogenesis of airway remodeling, the most incriminated one is vascular endothelial growth factor (VEGF) (16).

CysLTs are well characterized as major players in the pathophysiology of asthma and much evidence supports their role in different aspects of pulmonary remodeling (47). However, no direct link has been established between cysLTs and modulation of VEGF expression. In this work, we propose a mechanism through which cysLTs can lead to increased angiogenesis, namely through the upregulation of VEGF expression. We demonstrated that LTD<sub>4</sub>, via the CysLT1 receptor, induces the expression of VEGF at both the mRNA and protein levels in two cell types relevant to asthma and airway remodeling processes, namely human monocytes (48, 49) and the human BSMCs (50). These two cell types were already known to secrete VEGF and to express both CysLT1 and CysLT2 receptors, but CysLT2 is much less expressed than CysLT1 in hBSMCs (7). Interestingly, Simcock and colleagues recently showed that BSMC cultured from subjects with mild or moderate asthma, but not from healthy controls, promote angiogenesis *in vitro* via their release of VEGF (20).

In our single receptor models, HEKLT1 and HEKLT2, we observed VEGF promoter transactivation with cysLTs that was completely abrogated with a pretreatment with a CysLT1 antagonist in HEKLT1 cells and not affected in HEKLT2, as expected. In HEKLT1 cells, LTD<sub>4</sub> was shown to be more potent than LTC<sub>4</sub> in VEGF promoter activation, which is in concordance with the known affinity and potency of CysLT1 ligands: LTD<sub>4</sub>>LTC<sub>4</sub>>>LTE<sub>4</sub> (5). As already shown in a previous study(51), we also noticed that CysLT1 is probably coupled with Gα<sub>q</sub> protein in HEK293 cells since a pre-treatment with PTX did not affect the VEGF promoter transactivation by the cysLTs (data not shown). In HEKLT2 cells, LTC<sub>4</sub> was shown to be between 10 to 100-fold more potent than LTD<sub>4</sub> at low nanomolar concentrations. These results were not those expected from the affinity data for CysLT2 ligands: LTC<sub>4</sub>=LTD<sub>4</sub>>>LTDE<sub>4</sub> (5). However, we had shown in a recent study a similar relative potency of LTC<sub>4</sub> vs LTD<sub>4</sub> in CysLT2 mediated IL-8 promoter transactivation (39). These findings may be due to different conformational changes induced in the CysLT2 receptor by the two structurally different ligands (despite their equivalent affinities), which could differentially affect signaling pathways. Interestingly, the concentration-dependent VEGF promoter transactivation followed a bell-shaped pattern. Such bell-shaped curves suggest auto-antagonism at high concentrations of cysLTs, analogous to comparable patterns produced by other GPCR agonists (including cysLTs) that can be described in terms of a homotropic two-state system (52). As expected from the transcriptional activation capacity of cysLTs in luciferase assays, VEGF mRNA and protein levels were also increased by cysLT stimulation both in HEKLT1 and HEKLT2 cells.

VEGF gene transcription is under the control of a promoter containing many different transcriptions factor binding sites, but the major ones are HIF-1, AP-1, Sp1 and Stat3 (26,

28). HREs are DNA consensus sequences (5'-RCGTG-3') that bind to hypoxia-induced factor-1 (HIF-1). HIF-1 is a heterodimeric transcription factor composed of bHLH-PAS protein family members, most often HIF-1 $\beta$ , which is constitutively activated/expressed and HIF-1 $\alpha$  whose stability/activity/expression depends on various factors including hypoxia, MAPKs and PI3K (53). HIF-1 not only has a role in hypoxic modulation of VEGF but also in various non-hypoxic conditions. In fact, normoxic HIF-1-dependent VEGF expression can be increased by a variety of mediators including EGF, HER2/neu and NO (54-56), via the induction of HIF-1 $\alpha$  expression, increase in HIF-1 $\alpha$  DNA binding activity or HIF-1 $\alpha$  stability (26). Here, we demonstrated that LTD<sub>4</sub> could potentially increase HIF-1 $\alpha$  protein stability in HEKLT1 and that the increase in HIF-1 protein level could be functionally significant, using a CMV-luc-ODD and a HRE-tk-LUC construct, respectively. However, we did not observe any change in VEGF promoter transactivation when we used HRE mutants of the promoter, suggesting that HIF-1 is not implicated in *cysLT*-induced modulation of VEGF expression in normoxia. Importantly, since LTD<sub>4</sub> can affect HIF-1 $\alpha$  protein stability, we cannot exclude its implication in hypoxic or non-hypoxic HIF-1-dependent modulation of other genes.

From progressive 5' deletion studies of the VEGF promoter, it appears that the consensus transcription factor binding sequences that are present in the distal and middle promoter regions -1278 to -90 are not implicated in *cysLT*-induced modulation of VEGF expression. This includes the consensus binding sequences for Stat3, Smad3, Smad4, NF-1, c-myc and HIF-1. Analysis of the 1.0 kB promoter fragment revealed the presence one AP-1-binding site at position +419 bp within the region of the cryptic promoter of VEGF. Activator protein-1 (AP-1) is a dimeric transcription factor that includes members of the Jun and Fos families. Jun family proteins, represented by c-Jun, JunB, and JunD, and Fos family proteins,

represented by c-Fos, FosB, Fra-1, and Fra-2, form homo- or heterodimers that bind to the DNA consensus sequence TGAC/GTCA and regulate the activation of different target genes (57). Numerous studies had shown the implication of AP-1 in non-hypoxic VEGF modulation by EGF, PDGF or bFGF (26). Moreover, the AP-1 site at +419 bp in the human VEGF promoter was shown to be both necessary and sufficient for VEGF induction by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) in keratinocytes (58). On the other hand, activation of the MAPK pathway by cysLTs has been shown using various cell types (59), including HEKLT1 cells (unpublished data from our laboratory ) and this pathway is well known to activate the AP-1 transcription factor (44). Using pharmacologic inhibitors of MAPKs in HEKLT1, we found a partial implication of ERK1/2, JNK, but not p38, in VEGF promoter transactivation by LTD<sub>4</sub>. This observation can be explained because the MAPKs can be independently regulated and/or differently required for their effects on gene transcription in different situations (44, 60). For example, a recent study showed that cysLTs require Erk1/2 and JNK, but not p38 in the modulation of MCP-1 in monocytes/macrophages(61). The use of a dominant negative form of Ras, a protein well known to activate the Raf-Erk pathway (44), or dominant negative forms of AP-1 complex proteins, also inhibited VEGF promoter transactivation by LTD<sub>4</sub>. We had also previously shown the involvement of AP-1 complex activation in modulation of IL-8 expression by LTD<sub>4</sub> (40). To our surprise, mutation of the AP-1 binding site at +419 bp in the VEGF promoter had no effect on VEGF promoter transactivation by LTD<sub>4</sub>. These findings suggested an indirect implication of the AP-1 transcription factor in the VEGF modulation by LTD<sub>4</sub>.

Analysis of the 1.0kB VEGF promoter fragment revealed the presence of a cluster of Sp1 sites downstream of -90 bp, suggesting that Sp1 could be involved in VEGF promoter



transactivation by LTD<sub>4</sub>. Specificity protein 1 (Sp1) is a ubiquitously expressed homo-oligomeric transcription factor member of the Sp/KLF family that can bind DNA GC-boxes and with a lower affinity CT- or GT-boxes. It is now widely accepted that Sp1 is implicated in the expression of several different inducible genes (eg: VEGF), in the control of cellular proliferation and in tumorigenesis. Indeed, Sp1-dependent transcription can be regulated by post-translational modifications or by interactions with different proteins like transcriptions factors, oncogenes and tumor suppressors via synergism or superactivation (62). In fact, many studies had shown its implication in VEGF modulation, using different mediators, and its possible interaction/activation with the MAPKs and/or the AP-1 complex (26, 28). For example, Sp1 phosphorylation is necessary for VEGF induction in fibroblast and cardiac myocytes (by IL-1 $\beta$ ) via the Ras/Raf/ERK pathway or JNK and p38, respectively (63-65). Moreover, prostatic or cerebral cancer cells produce VEGF in a HIF-1-independent manner in normoxia (as it is the case here) and require Sp1 phosphorylation via PI3K/AKT(66), whereas VEGF induction by cyclosporine in renal cancer cell lines is also HIF-1-independent but requires Sp1 phosphorylation by PKC $\zeta$  and PKC $\delta$  (67). Also, the lipid mediator PGE<sub>2</sub> can induce VEGF in BSMC via Sp1 phosphorylation in a cAMP/PKA-dependent manner (68). Using HEKLT1 or HEKLT2 cells in luciferase assays, we showed that transactivation of the VEGF promoter by LTD<sub>4</sub> was totally prevented by a pretreatment with the Sp1-dependent transcription inhibitor mithramycin-A and the same effect was also observed at the mRNA and protein level in human monocytes after LTD<sub>4</sub> stimulation. More importantly, we showed that using a VEGF promoter with its 4 Sp1 binding sites mutated, the LTD<sub>4</sub> transactivation in HEKLT1 cells was completely abrogated whereas there was no transactivation of either the wild type or mutant form in HEKPAFR cells. In brief,

these results suggest that Sp1 is the major transcription factor implicated in VEGF modulation by the cysLTs. As shown in many studies (62), Sp1 can also be activated by the MAPKs. As for the role of AP-1, we suggest a synergistic or a superactivation effect between the AP-1 complex and Sp1 to explain our results. For instance, a synergistic effect between AP-1 and Sp1 has been reported for the modulation of CD11c gene(69). Moreover, there are examples of superactivation between c-jun and Sp1 for the modulation of p21 and vimentin (70, 71). The process of superactivation is when one Sp1 molecule binds to DNA whereas the superactivator does not bind to DNA, but interacts with the DNA-bound Sp1 molecule to increase its transcriptional activity (62).

In summary, we propose a new mechanism for cysLT involvement in airway remodeling. The current study suggests for the first time that cysLTs not only act in fibrogenesis, airway smooth muscle hyperplasia, myofibroblast proliferation or their other known activities in airway remodeling, but also in angiogenesis via their promotion of VEGF production. Thus, selective CysLT1 (and eventually CysLT2) antagonists could be considered for the more chronic aspects of asthma, such as airway remodeling, as well as in other diseases implicating both cysLTs and angiogenesis, including colorectal cancer and atherosclerosis.

- 1-Capra V., Thompson M.D., Sala A., Cole D.E., Folco G., and Rovati G.E. Cysteinyl-leukotrienes and their receptors in asthma and other inflammatory diseases: critical update and emerging trends. *Med Res Rev*; 2007;27(4):469-527.
- 2-Green S.A., Malice M.P., Tanaka W., Tozzi C.A., and Reiss T.F. Increase in urinary leukotriene LTE<sub>4</sub> levels in acute asthma: correlation with airflow limitation. *Thorax*; 2004;59(2):100-4.
- 3-Levy B.D., Bonnans C., Silverman E.S., Palmer L.J., Marigowda G., and Israel E. Diminished lipoxin biosynthesis in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*; 2005;172(7):824-30.
- 4-Devillier P., Baccard N. and Advenier C. Leukotrienes, leukotriene receptor antagonists and leukotriene synthesis inhibitors in asthma: an update. Part II: clinical studies with leukotriene receptor antagonists and leukotriene synthesis inhibitors in asthma. *Pharmacol Res*; 1999;40(1):15-29.
- 5-Hui Y. and Funk C.D. Cysteinyl leukotriene receptors. *Biochem Pharmacol*; 2002;64(11):1549-57.
- 6-Ciana P., Fumagalli M., Trincavelli M.L., Verderio C., Rosa P., Lecca D., Ferrario S., Parravicini C., Capra V., Gelosa P., Guerrini U., Belcredito S., Cimino M., Sironi L., Tremoli E., Rovati G.E., Martini C., and Abbracchio M.P. The orphan receptor GPR17 identified as a new dual uracil nucleotides/cysteinyl-leukotrienes receptor. *EMBO J*; 2006;25(19):4615-27.

- 7-Heise C.E., O'Dowd B.F., Figueroa D.J., Sawyer N., Nguyen T., Im D.S., Stocco R., Bellefeuille J.N., Abramovitz M., Cheng R., Williams D.L., Jr., Zeng Z., Liu Q., Ma L., Clements M.K., Coulombe N., Liu Y., Austin C.P., George S.R., O'Neill G.P., Metters K.M., Lynch K.R., and Evans J.F. Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. *J Biol Chem*; 2000;275(39):30531-6.
- 8-Bosse Y., Pare P.D. and Seow C.Y. Airway wall remodeling in asthma: from the epithelial layer to the adventitia. *Curr Allergy Asthma Rep*; 2008;8(4):357-66.
- 9-Warner S.M. and Knight D.A. Airway modeling and remodeling in the pathogenesis of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*; 2008;8(1):44-8.
- 10-Bosse Y., Thompson C., McMahon S., Dubois C.M., Stankova J., and Rola-Pleszczynski M. Leukotriene D4-induced, epithelial cell-derived transforming growth factor beta1 in human bronchial smooth muscle cell proliferation. *Clin Exp Allergy*; 2008;38(1):113-21.
- 11-Espinosa K., Bosse Y., Stankova J., and Rola-Pleszczynski M. CysLT1 receptor upregulation by TGF-beta and IL-13 is associated with bronchial smooth muscle cell proliferation in response to LTD4. *J Allergy Clin Immunol*; 2003;111(5):1032-40.
- 12-Porreca E., Di Febbo C., Di Sciullo A., Angelucci D., Nasuti M., Vitullo P., Reale M., Conti P., Cuccurullo F., and Poggi A. Cysteinyl leukotriene D4 induced vascular smooth muscle cell proliferation: a possible role in myointimal hyperplasia. *Thromb Haemost*; 1996;76(1):99-104.

- 13-Thompson C., McMahon S., Bosse Y., Dubois C.M., Stankova J., and Rola-Pleszczynski M. Leukotriene D4 up-regulates furin expression through CysLT1 receptor signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 2008;39(2):227-34.
- 14-Henderson W.R., Jr., Tang L.O., Chu S.J., Tsao S.M., Chiang G.K., Jones F., Jonas M., Pae C., Wang H., and Chi E.Y. A role for cysteinyl leukotrienes in airway remodeling in a mouse asthma model. *Am J Respir Crit Care Med*; 2002;165(1):108-16.
- 15-Henderson W.R., Jr., Chiang G.K., Tien Y.T., and Chi E.Y. Reversal of allergen-induced airway remodeling by CysLT1 receptor blockade. *Am J Respir Crit Care Med*; 2006;173(7):718-28.
- 16-Walters E.H., Soltani A., Reid D.W., and Ward C. Vascular remodelling in asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*; 2008;8(1):39-43.
- 17-Abdel-Rahman A.M., el-Sahrigy S.A. and Bakr S.I. A comparative study of two angiogenic factors: vascular endothelial growth factor and angiogenin in induced sputum from asthmatic children in acute attack. *Chest*; 2006;129(2):266-71.
- 18-Asai K., Kanazawa H., Kamoi H., Shiraishi S., Hirata K., and Yoshikawa J. Increased levels of vascular endothelial growth factor in induced sputum in asthmatic patients. *Clin Exp Allergy*; 2003;33(5):595-9.
- 19-Simcock D.E., Kanabar V., Clarke G.W., O'Connor B.J., Lee T.H., and Hirst S.J. Proangiogenic activity in bronchoalveolar lavage fluid from patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*; 2007;176(2):146-53.

- 20-Simcock D.E., Kanabar V., Clarke G.W., Mahn K., Karner C., O'Connor B.J., Lee T.H., and Hirst S.J. Induction of angiogenesis by airway smooth muscle from patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*; 2008;178(5):460-8.
- 21-Otrock Z.K., Makarem J.A. and Shamseddine A.I. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood Cells Mol Dis*; 2007;38(3):258-68.
- 22-Hoshino M., Nakamura Y. and Hamid Q.A. Gene expression of vascular endothelial growth factor and its receptors and angiogenesis in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol*; 2001;107(6):1034-8.
- 23-Kamio K., Sato T., Liu X., Sugiura H., Togo S., Kobayashi T., Kawasaki S., Wang X., Mao L., Ahn Y., Holz O., Magnussen H., and Rennard S.I. Prostacyclin analogs stimulate VEGF production from human lung fibroblasts in culture. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 2008;294(6):L1226-32.
- 24-Breen E.C. VEGF in biological control. *J Cell Biochem*; 2007;102(6):1358-67.
- 25-Lee C.G., Link H., Baluk P., Homer R.J., Chapoval S., Bhandari V., Kang M.J., Cohn L., Kim Y.K., McDonald D.M., and Elias J.A. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung. *Nat Med*; 2004;10(10):1095-103.
- 26-Xie K., Wei D., Shi Q., and Huang S. Constitutive and inducible expression and regulation of vascular endothelial growth factor. *Cytokine Growth Factor Rev*; 2004;15(5):297-324.

- 27-Josko J. and Mazurek M. Transcription factors having impact on vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression in angiogenesis. *Med Sci Monit*; 2004;10(4):RA89-98.
- 28-Pages G. and Pouyssegur J. Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene--a concert of activating factors. *Cardiovasc Res*; 2005;65(3):564-73.
- 29-Kanayasu T., Nakao-Hayashi J., Asuwa N., Morita I., Ishii T., Ito H., and Murota S. Leukotriene C4 stimulates angiogenesis in bovine carotid artery endothelial cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*; 1989;159(2):572-8.
- 30-Tsopanoglou N.E., Pipili-Synetos E. and Maragoudakis M.E. Leukotrienes C4 and D4 promote angiogenesis via a receptor-mediated interaction. *Eur J Pharmacol*; 1994;258(1-2):151-4.
- 31-Lee K.S., Kim S.R., Park H.S., Jin G.Y., and Lee Y.C. Cysteinyl leukotriene receptor antagonist regulates vascular permeability by reducing vascular endothelial growth factor expression. *J Allergy Clin Immunol*; 2004;114(5):1093-9.
- 32-Kanazawa H., Yoshikawa T., Hirata K., and Yoshikawa J. Effects of pranlukast administration on vascular endothelial growth factor levels in asthmatic patients. *Chest*; 2004;125(5):1700-5.
- 33-Atakan A., Arikan H., Macunluoglu B., Tuglular S., Ulfer G., Cakalagaoglu F., Ozener C., and Akoglu E. Renal protective effects of leukotriene receptor blockers in an

- experimental model of cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant Proc*; 2008;40(1):279-84.
- 34-Mizukami Y., Li J., Zhang X., Zimmer M.A., Iliopoulos O., and Chung D.C. Hypoxia-inducible factor-1-independent regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia in colon cancer. *Cancer Res*; 2004;64(5):1765-72.
- 35-Semenza G.L. and Wang G.L. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*; 1992;12(12):5447-54.
- 36-Tian H., McKnight S.L. and Russell D.W. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev*; 1997;11(1):72-82.
- 37-Song Y., Wu J., Oyesanya R.A., Lee Z., Mukherjee A., and Fang X. Sp-1 and c-Myc mediate lysophosphatidic acid-induced expression of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer cells via a hypoxia-inducible factor-1-independent mechanism. *Clin Cancer Res*; 2009;15(2):492-501.
- 38-Thivierge M., Stankova J. and Rola-Pleszczynski M. Toll-like receptor agonists differentially regulate cysteinyl-leukotriene receptor 1 expression and function in human dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol*; 2006;117(5):1155-62.
- 39-Thompson C., Cloutier A., Bosse Y., Poisson C., Larivee P., McDonald P.P., Stankova J., and Rola-Pleszczynski M. Signaling by the cysteinyl-leukotriene receptor 2. Involvement in chemokine gene transcription. *J Biol Chem*; 2008;283(4):1974-84.



- 40-Thompson C., Cloutier A., Bosse Y., Thivierge M., Gouill C.L., Larivee P., McDonald P.P., Stankova J., and Rola-Pleszczynski M. CysLT1 receptor engagement induces activator protein-1- and NF-kappaB-dependent IL-8 expression. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 2006;35(6):697-704.
- 41-Risse G., Jooss K., Neuberg M., Bruller H.J., and Muller R. Asymmetrical recognition of the palindromic AP1 binding site (TRE) by Fos protein complexes. *EMBO J*; 1989;8(12):3825-32.
- 42-Holgate S.T. The airway epithelium is central to the pathogenesis of asthma. *Allergol Int*; 2008;57(1):1-10.
- 43-Salnikow K., Donald S.P., Bruick R.K., Zhitkovich A., Phang J.M., and Kasprzak K.S. Depletion of intracellular ascorbate by the carcinogenic metals nickel and cobalt results in the induction of hypoxic stress. *J Biol Chem*; 2004;279(39):40337-44.
- 44-Raman M., Chen W. and Cobb M.H. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*; 2007;26(22):3100-12.
- 45-Blume S.W., Snyder R.C., Ray R., Thomas S., Koller C.A., and Miller D.M. Mithramycin inhibits SP1 binding and selectively inhibits transcriptional activity of the dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo. *J Clin Invest*; 1991;88(5):1613-21.
- 46-Nehls M.C., Brenner D.A., Gruss H.J., Dierbach H., Mertelsmann R., and Herrmann F. Mithramycin selectively inhibits collagen-alpha 1(I) gene expression in human fibroblast. *J Clin Invest*; 1993;92(6):2916-21.

- 47-Holgate S.T., Peters-Golden M., Panettieri R.A., and Henderson W.R., Jr. Roles of cysteinyl leukotrienes in airway inflammation, smooth muscle function, and remodeling. *J Allergy Clin Immunol*; 2003;111(1 Suppl):S18-34; discussion S34-6.
- 48-Holgate S.T. Airway inflammation and remodeling in asthma: current concepts. *Mol Biotechnol*; 2002;22(2):179-89.
- 49-Holgate S.T. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy*; 2008;38(6):872-97.
- 50-Tliba O., Amrani Y. and Panettieri R.A., Jr. Is airway smooth muscle the "missing link" modulating airway inflammation in asthma? *Chest*; 2008;133(1):236-42.
- 51-Lynch K.R., O'Neill G.P., Liu Q., Im D.S., Sawyer N., Metters K.M., Coulombe N., Abramovitz M., Figueroa D.J., Zeng Z., Connolly B.M., Bai C., Austin C.P., Chateaufneuf A., Stocco R., Greig G.M., Kargman S., Hooks S.B., Hosfield E., Williams D.L., Jr., Ford-Hutchinson A.W., Caskey C.T., and Evans J.F. Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nature*; 1999;399(6738):789-93.
- 52-Bindslev N. A homotropic two-state model and auto-antagonism. *BMC Pharmacol*; 2004;4:11.
- 53-Weidemann A. and Johnson R.S. Biology of HIF-1alpha. *Cell Death Differ*; 2008;15(4):621-7.
- 54-Laughner E., Taghavi P., Chiles K., Mahon P.C., and Semenza G.L. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha)

- synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol*; 2001;21(12):3995-4004.
- 55-Sandau K.B., Faus H.G. and Brune B. Induction of hypoxia-inducible-factor 1 by nitric oxide is mediated via the PI 3K pathway. *Biochem Biophys Res Commun*; 2000;278(1):263-7.
- 56-Zhong H., Chiles K., Feldser D., Laughner E., Hanrahan C., Georgescu M.M., Simons J.W., and Semenza G.L. Modulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res*; 2000;60(6):1541-5.
- 57-Hess J., Angel P. and Schorpp-Kistner M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci*; 2004;117(Pt 25):5965-73.
- 58-Diaz B.V., Lenoir M.C., Ladoux A., Frelin C., Demarchez M., and Michel S. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes by retinoids. *J Biol Chem*; 2000;275(1):642-50.
- 59-Rovati G.E. and Capra V. Cysteinyl-leukotriene receptors and cellular signals. *ScientificWorldJournal*; 2007;7:1375-92.
- 60-Owens D.M. and Keyse S.M. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene*; 2007;26(22):3203-13.
- 61-Hashimoto K., Ichiyama T., Hasegawa M., Hasegawa S., Matsubara T., and Furukawa S. Cysteinyl Leukotrienes Induce Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Human

- Monocyte/Macrophages via Mitogen-Activated Protein Kinase and Nuclear Factor-kappaB Pathways. *Int Arch Allergy Immunol*; 2009;149(3):275-282.
- 62-Wierstra I. Sp1: emerging roles--beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes. *Biochem Biophys Res Commun*; 2008;372(1):1-13.
- 63-Milanini J., Vinals F., Pouyssegur J., and Pages G. p42/p44 MAP kinase module plays a key role in the transcriptional regulation of the vascular endothelial growth factor gene in fibroblasts. *J Biol Chem*; 1998;273(29):18165-72.
- 64-Milanini-Mongiat J., Pouyssegur J. and Pages G. Identification of two Sp1 phosphorylation sites for p42/p44 mitogen-activated protein kinases: their implication in vascular endothelial growth factor gene transcription. *J Biol Chem*; 2002;277(23):20631-9.
- 65-Tanaka T., Kanai H., Sekiguchi K., Aihara Y., Yokoyama T., Arai M., Kanda T., Nagai R., and Kurabayashi M. Induction of VEGF gene transcription by IL-1 beta is mediated through stress-activated MAP kinases and Sp1 sites in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*; 2000;32(11):1955-67.
- 66-Pore N., Liu S., Shu H.K., Li B., Haas-Kogan D., Stokoe D., Milanini-Mongiat J., Pages G., O'Rourke D.M., Bernhard E., and Maity A. Sp1 is involved in Akt-mediated induction of VEGF expression through an HIF-1-independent mechanism. *Mol Biol Cell*; 2004;15(11):4841-53.

- 67-Basu A., Contreras A.G., Datta D., Flynn E., Zeng L., Cohen H.T., Briscoe D.M., and Pal S. Overexpression of vascular endothelial growth factor and the development of post-transplantation cancer. *Cancer Res*; 2008;68(14):5689-98.
- 68-Bradbury D., Clarke D., Seedhouse C., Corbett L., Stocks J., and Knox A. Vascular endothelial growth factor induction by prostaglandin E2 in human airway smooth muscle cells is mediated by E prostanoid EP2/EP4 receptors and SP-1 transcription factor binding sites. *J Biol Chem*; 2005;280(34):29993-30000.
- 69-Noti J.D., Reinemann B.C. and Petrus M.N. Sp1 binds two sites in the CD11c promoter in vivo specifically in myeloid cells and cooperates with AP1 to activate transcription. *Mol Cell Biol*; 1996;16(6):2940-50.
- 70-Kardassis D., Papakosta P., Pardali K., and Moustakas A. c-Jun transactivates the promoter of the human p21(WAF1/Cip1) gene by acting as a superactivator of the ubiquitous transcription factor Sp1. *J Biol Chem*; 1999;274(41):29572-81.
- 71-Wu Y., Zhang X. and Zehner Z.E. c-Jun and the dominant-negative mutant, TAM67, induce vimentin gene expression by interacting with the activator Sp1. *Oncogene*; 2003;22(55):8891-901.

## 5- DISCUSSION

L'angiogenèse, un processus souvent nécessaire physiologiquement, peut s'avérer pathologique dans certaines situations. Par exemple, l'augmentation de l'angiogenèse est nécessaire à la croissance de plusieurs tumeurs (ex : colorectal) et est impliqué dans diverses pathologies inflammatoires comme le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde et l'athérosclérose (CARMELIET, 2005). De plus, le remodelage des voies respiratoires dans l'asthme implique plusieurs processus dont l'augmentation de l'angiogenèse (BOSSE *et al.*, 2008). Plusieurs médiateurs ont été incriminés pour expliquer cette composante de remodelage comme par exemple bFGF, l'angiogénine et les angiopoïétines-1,2, mais le plus étudié et le plus probable est le VEGF (CHETTA *et al.*, 2005, WALTERS *et al.*, 2008).

Les cysteinyl-leucotriènes ont un rôle essentiel dans la pathophysiologie de l'asthme et ils sont de plus en plus reconnus comme des médiateurs importants du remodelage des voies respiratoires (HOLGATE *et al.*, 2003). Cependant, aucune évidence dans la littérature n'a clairement montrée un lien entre les cysLTs et la modulation du VEGF et/ou l'angiogenèse. Notre laboratoire a émis l'hypothèse que les cysLTs puissent réguler l'angiogenèse du remodelage des voies respiratoires de l'asthme en agissant comme modulateurs de l'expression du VEGF via les récepteurs CysLT1 et/ou CysLT2. Également, puisque la signalisation des récepteurs des cysLTs n'est pas encore très bien définie dans la littérature, nous avons voulu étudier les voies intracellulaires impliquées spécifiquement pour CysLT1 ou CysLT2.

Premièrement, puisque le remodelage des voies respiratoires implique à la fois des cellules inflammatoires et structurales (HOLGATE, 2008), nous avons choisi d'utiliser ces deux types cellulaires afin de tester notre hypothèse de modulation du VEGF par les cysLTs. Nous avons donc opté pour des monocytes humains provenant de leucocytes périphériques sanguins de donneurs sains et des cellules musculaires lisses humaines (provenant d'un homme de race noire de 5 semaines sans maladie connue). Les monocytes sont capables de se différencier en macrophages via GM-CSF ou en cellules dendritiques via GM-CSF et IL-4 (GAJEWSKA *et al.*, 2003). Dans l'asthme chronique, particulièrement l'asthme corticostéroïde-résistant, les monocytes et les macrophages sont des cellules infiltrant la muqueuse respiratoire en grand nombre et sont importantes dans sa pathophysiologie (HOLGATE, 2008). Les deux sont connues pour sécréter du VEGF (HOSHINO *et al.*, 2001), des cysLTs, des ROS, des enzymes lysosomales et bien d'autres médiateurs inflammatoires (HOLGATE, 2008). D'autre part, les cellules musculaires lisses bronchiques (CMLBs) sont reconnues depuis peu comme étant bien plus que de simples cellules structurales. En fait, après leur interaction avec des stimuli inflammatoires ou des produits bactériens ou viraux (via leur TLRs), ils peuvent sécréter des médiateurs ou molécules de surface impliqués dans l'installation/perpétuation de l'inflammation et le remodelage des voies respiratoires (TLIBA *et al.*, 2008). Par exemple, l'expression de l'ARNm de la métalloprotéase ADAM33 dans les cellules musculaires lisses est augmentée dans l'asthme modéré ou sévère par rapport à l'asthme léger ou les patients contrôles (FOLEY *et al.*, 2007). Aussi, l'activation des CMLBs par TNF- $\alpha$ , une cytokine présente en grande quantité dans les voies respiratoires d'asthmatiques, est capable d'augmenter l'expression de ICAM-1 à leur surface (LAZAAR *et al.*, 1994). Fait intéressant, le groupe de Simcock a récemment démontré que les CMLBs de patients

asthmatiques (mais pas celles de patients sains) induisaient l'angiogenèse *in vitro* via leur sécrétion de VEGF (SIMCOCK *et al.*, 2008), suggérant ainsi leur implication dans le processus angiogénique du remodelage des voies respiratoires. Les deux types cellulaires choisis sont connus pour exprimer les récepteurs des cysLTs à leur surface. Plus précisément, l'expression de CysLT1 et de CysLT2 serait également répartie chez les monocytes, tandis que les cellules musculaires lisses exprimeraient plus fortement CysLT1 par rapport à CysLT2 (CAPRA *et al.*, 2007).

Afin de savoir si les cysLTs modulent l'expression du VEGF dans ces cellules, nous avons utilisé les techniques de PCR en temps réel (ARNm) et d'ELISA (protéine). Pour le PCR, nous avons utilisé des amorces ne faisant pas la distinction entre les différents isoformes du VEGF-A étant donné que nous voulions d'abord être certain qu'il y a une modulation. Pour l'ELISA, le kit utilisé était spécifique à l'isoforme VEGF-A<sub>165</sub> (le principal isoforme connu) (OTROCK *et al.*, 2007). Dans de futures expériences, il serait intéressant d'essayer de faire des distinctions entre les différents isoformes. Les mesures de VEGF-A avaient lieu après une stimulation avec LTD<sub>4</sub> (ou son véhicule EtOH) à une concentration de 10 nM pendant les temps indiqués. Cette concentration a été choisie pour trois raisons : la première était que d'autres études avaient préalablement démontré que 10 nM était efficace avec les types cellulaires utilisés (PANETTIERI *et al.*, 1998, THOMPSON *et al.*, 2006, THOMPSON *et al.*, 2008), la deuxième était que les EC50 connus pour LTD<sub>4</sub> avec différents types cellulaires sont majoritairement inférieurs à 10 nM (CAPRA *et al.*, 2007) et la troisième était que nous voulions utiliser une concentration la plus faible possible pour que nos résultats soient biologiquement pertinents.



Premièrement, nous avons observé une augmentation significative de l'ARNm du VEGF chez les monocytes stimulés à partir de 6h et qui persiste jusqu'à au moins 24h. L'induction de l'ARNm du VEGF est complètement bloquée par l'antagoniste du CysLT1 ce qui laisse croire qu'elle est entièrement dépendante du récepteur CysLT1 chez les monocytes humains. D'ailleurs, ces résultats sont reproductibles au niveau de la protéine du VEGF après 24h de stimulation. Chez les cellules musculaires lisses, l'augmentation significative de l'ARNm après 12h de stimulation avec LTD<sub>4</sub> semble également être dépendante du récepteur CysLT1. De plus, même si elle semble être moins importante que chez les monocytes, il y a une augmentation significative du niveau de protéine du VEGF après 24h de stimulation avec LTD<sub>4</sub> chez les CMLBs. Même si les niveaux de base de protéine VEGF en pg/mL sont plus élevés que ceux observés avec les monocytes, nous ne pouvons pas tirer de conclusion à ce sujet puisque le nombre de cellules en suspensions (monocytes) ou adhérentes (cellules musculaires lisses) n'a pas été ajusté pour être équivalent. Bref, aux meilleurs de mes connaissances, ces résultats sont les premiers à démontrer la capacité de LTD<sub>4</sub> à moduler l'expression du facteur angiogénique VEGF via CysLT1 et par surcroît, dans ces cellules pertinentes aux phénomènes du remodelage des voies respiratoires (HOLGATE, 2008).

Afin de vérifier si la modulation du VEGF par les cysLTs avait lieu au niveau transcriptionnel, nous avons procédé à des essais de transactivation du promoteur VEGF en amont du gène de la luciférase. Autant avec les cellules HEKLT1 que HEKLT2, nous avons observé une réponse dépendante de la concentration pour l'activation du promoteur du VEGF. En utilisant du Montelukast en prétraitement, nous avons montré que l'effet semblait bel et bien être dépendant de CysLT1 chez les HEKLT1 et probablement

dépendant de CysLT2 chez les HEKLT2 puisqu'il y avait respectivement une perte complète et aucun effet sur l'activation du promoteur. Chez les HEKLT1, l'utilisation de LTD<sub>4</sub> a montré une efficacité d'activation supérieure à LTC<sub>4</sub> puisqu'il en nécessite environ 10x moins pour obtenir une induction relative identique de 4 fois. De plus, l'activation maximale atteinte par LTD<sub>4</sub> est d'environ 6 fois à 10 nM tandis qu'elle est de 4 fois avec 10 nM de LTC<sub>4</sub>. Ces résultats sont donc en accord avec l'affinité et la puissance connu des ligands de CysLT1, c'est-à-dire LTD<sub>4</sub>>LTC<sub>4</sub>>>LTE<sub>4</sub> (BACK, 2002). Fait intéressant, l'activation du promoteur du VEGF chez les HEKLT1 à une forme de «cloche» souvent observé lors de la stimulation de différents GPCRs comme par exemple la courbe concentration-réponse de la stimulation de lymphocytes B par LTD<sub>4</sub> qui résulte en l'expression de transcrits epsilon matures (LAMOUREUX *et al.*, 2006), la courbe concentration-réponse de l'activité chimiotactique induite par LTB<sub>4</sub> chez les cellules CHO-BLT1 (YOKOMIZO *et al.*, 1997) et la courbe concentration-réponse de l'activation du promoteur IL-8 par LTC<sub>4</sub> chez les cellules HEKLT2 (THOMPSON *et al.*, 2008). Cette forme de cloche peut être expliquée par un phénomène d'auto-antagoniste à haute concentration par le ligand du GPCR dans le contexte d'un système homotropique avec deux états conformationnels (BINDSLEV, 2004). Au niveau des HEKLT2, l'utilisation de LTC<sub>4</sub> a montré une capacité d'activation supérieure à LTD<sub>4</sub>. En fait, il y a une différence d'environ 100 fois dans la concentration nécessaire pour obtenir une induction relative équivalente. L'activation maximale semble être obtenue entre 1 et 10 nM de LTC<sub>4</sub> tandis que l'effet maximal de LTD<sub>4</sub> a lieu entre 10 et 100 nM. Bien que moins évidente que chez les HEKLT1, la forme de cloche de l'activation du promoteur VEGF chez les HEKLT2 semble être présente pour LTC<sub>4</sub> comme préalablement observé par une étude avec le promoteur de IL-8 (THOMPSON *et al.*, 2008). Pour ce qui est de

LTD<sub>4</sub>, nous pouvons extrapoler en disant qu'il a probablement une diminution de l'activation du promoteur avec de plus fortes concentrations (formant ainsi une «cloche») mais nous n'avons pas jugé utile de le vérifier. Les résultats observés pour HEKLT2 sont différents de ce que l'on retrouve classiquement dans la littérature à propos de la puissance et affinité des cysLTs pour CysLT2 (LTC<sub>4</sub>=LTD<sub>4</sub>>LTE<sub>4</sub>) (BACK, 2002). Cependant, des résultats semblables ont été publiés par notre laboratoire avec l'utilisation des HEKLT2 et le promoteur du IL-8 en essai luciférase (THOMPSON *et al.*, 2008). Malgré leur affinité équivalente, LTC<sub>4</sub> et LTD<sub>4</sub> ont des structures différentes (KANAOKA et BOYCE, 2004). L'hypothèse proposée est donc que les deux cysLTs peuvent induire des changements de conformation différents au niveau de CysLT2 et ainsi avoir des effets maximaux différents dans certaines voies de signalisation.

Les essais luciférase indiquent seulement la capacité d'activation transcriptionnelle du promoteur utilisé dans une conformation et contexte fort différent (sous forme de plasmide) que lorsqu'il est inclut dans le génome des cellules. Donc, les résultats observés en essais luciférase montrent une possibilité d'action transcriptionnelle par les médiateurs impliqués, mais il est important de corroborer les résultats au niveau de l'ARNm et des protéines si nous voulons conclure quoi que ce soit. En utilisant le PCR en temps réel et l'ELISA, nous avons donc montré qu'autant chez les HEKLT1 que chez les HEKLT2, les cysLTs peuvent effectivement moduler l'ARNm et la protéine du VEGF. Bref, ces résultats suggèrent pour la première fois que les cysLTs agissent au niveau transcriptionnel pour moduler l'ARNm du VEGF via CysLT1 ou CysLT2 et qu'il y a une modulation conséquente du niveau de sa protéine. À ce stade-ci, nous ne pouvons cependant pas exclure la possibilité d'un effet de stabilisation de l'ARNm du VEGF par

les cysLTs conjointement à l'activité transcriptionnelle. Pour ce faire, nous pourrions répéter les expériences de PCR en temps réel ou d'ELISA avec un inhibiteur de la transcription tel l'actinomycine D et/ou déterminer la demi-vie de l'ARNm du VEGF. Bien qu'il n'existe pas à ma connaissance de publications démontrant un rôle des cysLTs dans la stabilisation de quelconque ARNm, un médiateur lipidique, tel LTB<sub>4</sub>, peut stabiliser l'ARNm de l'IL-6 chez les monocytes humains (ROLA-PLESZCZYNSKI et STANKOVA, 1992). De plus, plusieurs exemples existent au niveau de la stabilisation de l'ARNm du VEGF comme l'hypoxie et le TNF- $\alpha$  via les protéines HuR agissant au niveau de la région 3'UTR (et possiblement 5'UTR) de l'ARNm (NABORS *et al.*, 2003).

La prochaine étape était de mieux caractériser les voies de signalisation impliquées. Le facteur de transcription HIF-1 à un rôle majeur dans la modulation du VEGF non seulement en hypoxie mais également dans plusieurs situations en normoxie, comme par exemple via sa stabilisation impliquant la voie PI3K/AKT (XIE *et al.*, 2004). Nous avons émis l'hypothèse que les cysLTs pourraient stabiliser la protéine HIF-1 $\alpha$  en situation de normoxie et ainsi moduler le VEGF. Pour tester notre hypothèse, nous avons transfecté de façon transitoire chez les cellules HEKLT1 une construction (CMV-luc-ODD) exprimant le fragment ODD (responsable de la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  (LEE *et al.*, 2004)) couplé à la protéine luciférase et avons observé une augmentation de la luminosité en essai luciférase après stimulation avec LTD<sub>4</sub>. Cette observation démontrait que LTD<sub>4</sub> pourrait mener à la stabilisation de la protéine HIF-1 $\alpha$  puisque si ce n'était pas le cas, la protéine ODD-luc exprimée aurait été dégradée (les HEK 293 ont un système pVHL/ubiquitination/dégradation fonctionnel (ZHOU *et al.*, 2004)) et nous n'aurions pas observé une augmentation de luminosité. Étant donné que des résultats non publiés de

notre laboratoire avait seulement montré une faible expression de HIF-1 $\alpha$  chez les HEKLT1 (même si les HEK293 exprime un HIF-1 $\alpha$  fonctionnel tel que vu dans la littérature (BAE *et al.*, 2002, CHO *et al.*, 2006, GOTHIE *et al.*, 2000)), nous avons voulu vérifier si la possible stabilisation du HIF-1 $\alpha$  endogène dans les HEKLT1 en normoxie après la stimulation par LTD<sub>4</sub> était fonctionnellement significative. Pour ce faire, nous avons transfecté un plasmide HRE-tk-LUC, créé en insérant 3 copies du site HRE du gène EPO et un promoteur minimal thymidine kinase dans le plasmide pGL3 (SEMENZA et WANG, 1992, TIAN *et al.*, 1997). Nous avons noté une augmentation significative, bien que relativement faible, de la luminosité après la stimulation avec LTD<sub>4</sub>. Donc, l'augmentation de la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  par LTD<sub>4</sub> serait significative du point de vue fonctionnel. Enfin, nous avons vérifié notre hypothèse en utilisant des mutants des sites HRE dans le promoteur du VEGF en essai luciférase. Nous avons noté qu'il n'y avait aucun changement dans l'activation du promoteur induite par LTD<sub>4</sub>. Ici, il aurait été intéressant d'utiliser un double mutant pour les 2 sites HRE du promoteur VEGF que nous utilisions, mais avec les résultats suivants (délétions en 5') nous n'avons pas jugé utile de le faire. Bref, contrairement à notre hypothèse de départ, les cysLTs ne semblent pas moduler le VEGF via HIF-1 $\alpha$  en normoxie. Cependant, il est probable qu'ils puissent tout de même stabiliser la protéine HIF-1 $\alpha$  et avoir un rôle d'induction d'autres gènes dépendant de HIF-1 $\alpha$  en normoxie ou hypoxie, ou même avoir un effet de synergie dans l'induction du VEGF en hypoxie (une hypothèse que nous n'avons pas vérifié). Nous n'avons pas répété ces expériences avec les HEKLT2 à cause des autres résultats (délétions en 5')

Ensuite, toujours dans le but de mieux caractériser les voies de signalisation impliquées, nous avons répété les essais luciférase chez les HEKLT1 ou HEKLT2 avec des mutants tronqués en 5' du promoteur du VEGF sauvage. Nous pouvons constater que même avec le plus petit mutant (1.0kB), le niveau d'activation du promoteur est identique au promoteur complet (2.3kB). Ainsi, nous pouvons supposer que tous les sites inclut dans la région tronquée ne sont pas impliqués dans l'activation transcriptionnelle du VEGF. Bref, il n'y aurait pas d'implication du HIF-1 $\alpha$ , (corroborant ainsi nos précédentes observations avec les mutants HRE) ni des facteurs de transcription Stat3, Smad3,4, NF-1 ou c-Myc dans la transactivation du promoteur de VEGF par LTD<sub>4</sub>.

En analysant les sites de facteurs de transcription encore disponibles dans le promoteur VEGF-WT 1.0 kB, nous avons émis l'hypothèse que le site AP-1 à 419 pb dans le «cryptic promoter» était le site impliqué dans ce contexte. D'ailleurs, plusieurs exemples existent dans la littérature démontrant l'implication du complexe AP-1 dans la modulation du VEGF en normoxie comme avec les facteurs de croissance EGF, PDGF et bFGF chez les cellules de glioblastome humaines (XIE *et al.*, 2004). De plus, il existe au moins un exemple dans la littérature démontrant spécifiquement que le site AP-1 à 419 pb est à la fois suffisant et nécessaire à l'induction du VEGF via 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) chez des kératinocytes (DIAZ *et al.*, 2000). Étant donné que le complexe AP-1 est majoritairement activé par la voie des MAPKs (CHANG et KARIN, 2001) et qu'il est activable dans les HEKLT1 (ou HEKLT2) (THOMPSON *et al.*, 2008, THOMPSON *et al.*, 2006) et d'autres types cellulaires stimulés par des cysLTs (ROVATI et CAPRA, 2007), nous avons d'abord utilisé des inhibiteurs pharmacologiques de cette voie en prétraitement dans des essais luciférase avec les HEKLT1. Nos résultats

suggèrent une implication partielle des MAPKs JNK et ERK1/2, mais pas de p38, dans l'activation du promoteur du VEGF. D'ailleurs, des résultats préliminaires en essais MAPKs (Western Blot) ont montré une forte phosphorylation des MAPKs JNK et ERK1/2 mais pas de p38 chez les HEKLT1 après un traitement avec LTD<sub>4</sub>. De plus, une étude récente a montré que chez les monocytes/macrophages, les cysLTs peuvent induire MCP-1 d'une façon ERK1/2 et JNK dépendant mais p38 indépendante (HASHIMOTO *et al.*, 2009). Cependant, d'autres études avec des types cellulaires différents comme THP-1 et Monomac-1 montrent que LTD<sub>4</sub> via CysLT1 peut activer toutes les MAPKs (JNK, ERK, p38) (ROVATI et CAPRA, 2007, THOMPSON *et al.*, 2008, THOMPSON *et al.*, 2008). Cette différence pourrait peut-être s'expliquer par un phénomène de signalisation intracellulaire dépendant de chaque type cellulaire. En effet, il est bien connu que l'interaction entre un stimulus et son récepteur peut mener à l'activation indépendante d'une MAPK par rapport à une autre (RAMAN *et al.*, 2007). Sinon, il pourrait s'agir de différentes erreurs : une inhibition non complète de l'activation de p38 (malgré la forte concentration utilisée de SB203540) avec un résultat non représentatif de la réalité dans les western blot préliminaires qui ne montreraient pas l'activation de p38, ou une bonne inhibition par SB203580 avec un western blot de p38 représentatif de la réalité. Dans le dernier cas, il existe plusieurs exemples montrant que même si une interaction stimulus/récepteur active toute les MAPKs, l'action finale peut dépendre que de seulement une ou plusieurs MAPKs (HESS *et al.*, 2004, RAMAN *et al.*, 2007). Ensuite, pour démontrer d'une autre façon l'implication d'AP-1, nous avons utilisé des formes dominantes négatives de protéines formant le complexe AP-1 (FosB et JunD) et une protéine bien connue pour activer la voie de ERK1/2, soit Ras (CHANG et KARIN, 2001). Ici, même si les protéines FosB et JunD ne sont pas les principales protéines du

complexe AP-1 (c-fos et c-jun) (HESS *et al.*, 2004), l'effet final est le même puisque leur forme dominante négative agit comme un chélateur des protéines de type sauvage (comme c-fos, c-jun, etc), empêchant ensuite la liaison du complexe AP-1 à l'ADN. Nous avons observé une inhibition partielle de l'activation du promoteur VEGF par LTD<sub>4</sub> chez les HEKLT1 transfectés avec les formes dominantes négatives, suggérant encore une fois l'implication de AP-1. Le fait que l'inhibition ne soit jamais complète pourrait être dû à la coopération de AP-1 avec d'autres facteurs de transcription dans la transactivation ou à l'inhibition non complète de l'action des protéines par les dominants négatifs. De plus, l'inhibition non complète par le dominant négatif de Ras ou les inhibiteurs pharmacologiques des MAPKs (en plus de la possibilité d'une action non maximale de ces molécules) pourrait être due à la coopération des MAPKs dans l'activation de AP-1. Ainsi, le blocage d'une seule MAPK (ex : ERK) pourrait être compensé par l'action d'une autre (ex : JNK). Pour vérifier cette hypothèse, nous aurions pu utiliser différents inhibiteurs en même temps pour bloquer plus d'une voie à la fois. Enfin, puisque tout indiquait l'implication du site AP-1 à 419 pb, nous avons créé un mutant de ce site (connu pour ne pas être en mesure de lier AP-1 (DIAZ *et al.*, 2000)) dans le plasmide VEGF-WT-2.3 kB. Curieusement, nous n'avons pas noté de diminution dans l'activation du promoteur du VEGF par LTD<sub>4</sub> chez les HEKLT1 en utilisant cette construction. Nous n'avons pas vérifié ces données chez les HEKLT2 pour le moment. Bien sûr, il aurait été pertinent de faire le mutant AP-1 chez la construction VEGF-WT-1.0 kB pour éliminer les possibilité de compensation par les autres sites AP-1 disponibles, mais les résultats suivants (Sp1 et mithramycine) étaient assez intéressants pour continuer sans ce mutant.



Avec les résultats du mutant AP-1, nous avons dû tourner notre attention vers un autre site disponible dans la plus petite construction du promoteur du VEGF (1.0 kB) pour expliquer nos observations. Le choix s'est rapidement arrêté vers Sp1 étant donné qu'il y a beaucoup d'évidences dans la littérature montrant son implication dans la modulation du VEGF et son interaction avec la voie des MAPKs et le complexe AP-1 (PAGES et POUYSSEGUR, 2005, WIERSTRA, 2008, XIE *et al.*, 2004). Par exemple, il a été montré que la phosphorylation de Sp1 via la voie Ras/Raf/Erk est nécessaire à l'induction du VEGF dans des fibroblastes (MILANINI *et al.*, 1998, MILANINI-MONGIAT *et al.*, 2002), que la modulation du VEGF par IL-1b implique la phosphorylation de Sp1 via JNK et p38 dans les myocytes cardiaques (TANAKA *et al.*, 2000), que le HGF induit le VEGF via la phosphorylation de Sp1 par PI3K, MEK1/2 et PCK zêta (REISINGER *et al.*, 2003), et que dans des cellules de fibrosarcomes et carcinomes rénaux, la phosphorylation de Sp1 via PI3K, Ras et PKC $\zeta$  est nécessaire (PAL *et al.*, 1998, PAL *et al.*, 2001). Par ailleurs, chez des cellules cancéreuses cérébrales ou de prostate, l'induction du VEGF est indépendante de HIF-1 et nécessite la phosphorylation de Sp1 via PI3K/Akt (PORE *et al.*, 2004), il en est de même de la cyclosporine qui induit le VEGF d'une façon HIF-1 indépendante via la phosphorylation de Sp1 par PKC $\zeta$  et PKC $\delta$  (BASU *et al.*, 2008). Plusieurs autres médiateurs peuvent induire le VEGF via l'activation de Sp1 comme par exemple l'acide rétinoïque (cellules de carcinomes bronchoalvéolaires) (MAENO *et al.*, 2002), le TNF- $\alpha$  (cellules de glioblastome) (RYUTO *et al.*, 1996) et le PDGF (fibroblastes) (FINKENZELLER *et al.*, 1997). De plus, un médiateur lipidique, la PGE<sub>2</sub>, induit le VEGF via la phosphorylation de Sp1 d'une façon dépendante de camp/PKA chez les cellules musculaires lisses pulmonaires (BRADBURY *et al.*, 2005). Bref, pour tester

notre hypothèse nous avons d'abord répété les essais luciférase avec les cellules HEKLT1 et HEKLT2 mais avec un prétraitement avec l'inhibiteur de la transcription dépendante de Sp1, la mithramycine. Comme nous pouvons le constater, l'activation du promoteur du VEGF par les cysLTs est complètement perdue avec ce traitement. De plus, nous avons répété les expériences de PCR en temps réel et d'ELISA chez des monocytes humains avec un prétraitement à la mithramycine et avons observé la même inhibition. Bref, ces résultats nous laissent croire que le facteur de transcription principal dans la modulation du VEGF par les cysLTs est Sp1. Bien sûr, même si des publications l'utilisent pour conclure qu'une transcription est Sp1 dépendante, il existe une possibilité que la mithramycine ne soit pas totalement spécifique pour Sp1. Ainsi, nous avons utilisé une forme sauvage et mutante d'un promoteur du VEGF (-123 à +50pb) et avons observé une perte complète de la capacité de transactivation de ce promoteur par LTD<sub>4</sub> chez les HEKLT1 lorsque tous les sites Sp1 sont mutés. Fait intéressant, nous avons également utilisé une autre lignée cellulaire, les HEKPAFR, pour démontrer que la transactivation du promoteur VEGF via les sites Sp1 semble être spécifique à l'interaction LTD<sub>4</sub>/CysLT1 puisque l'interaction PAF/PAFR ne menait à aucune activation du promoteur VEGF (-123 à +50) sauvage.

À propos des résultats précédant montrant l'implication des MAPKs et d'AP-1, nous avons émis l'hypothèse qu'il existe une interaction entre eux et Sp1 pour son activation ou action. En effet, tel que montré plus haut, il existe plusieurs exemples dans la littérature montrant l'activation de Sp1 par la phosphorylation des MAPKs. Cependant, cela n'expliquerait pas pourquoi nous observons une baisse de l'activation du promoteur du VEGF par des dominants négatifs de AP-1. À ce propos, nous avons émis l'hypothèse que

AP-1 pourrait agir en synergie ou via le processus de superactivation de Sp1. Ici, le synergisme est le procédé par lequel un facteur de transcription lie l'ADN d'une façon coopérative avec Sp1 ou augmente la capacité de recrutement de la machinerie basale de transcription. Ainsi, le facteur de transcription agissant en synergie lie l'ADN à un site distinct par rapport à celui déjà occupé par Sp1. Pour ce qui est de la superactivation, il s'agit de la capacité d'une protéine (Sp1 ou certains autres facteurs de transcription) à lier une protéine Sp1 déjà liée à l'ADN pour en augmenter son activité transcriptionnelle sans toutefois interagir directement avec l'ADN (pas de liaison directe). Bien qu'il n'existe pas d'exemple précis pour le VEGF, il existe des exemples de synergie entre AP-1 et Sp1 pour le gène CD11c (NOTI *et al.*, 1996). De plus, il existe des exemples de superactivation entre c-jun et Sp1 pour les gènes p21 et vimentine (KARDASSIS *et al.*, 1999, WU *et al.*, 2003). À ce stade-ci, nous ne pouvons pas confirmer ces hypothèses car il faudrait probablement faire des essais CHIP pour le déterminer (ex : est-ce que AP-1 et Sp1 lient le promoteur du VEGF ? est-ce que AP-1 se lie à un Sp1 déjà lié à l'ADN?) ou utiliser des essais de transactivation avec des constructions GAL4-Sp1 tel qu'utilisé dans la littérature pour évaluer les potentiels de superactivation d'un facteur de transcription avec Sp1 (WIERSTRA, 2008).

Puisqu'aucune étude n'avait auparavant démontré l'activation de Sp1 par les récepteurs des cysLTs, nous avons voulu caractériser un peu plus précisément les voies de signalisation impliquées à ce niveau. Premièrement, nous avons confirmé que le récepteur CysLT1 surexprimé par les HEK293 est probablement couplé à  $G\alpha_{q/11}$  tel que démontré dans la littérature (LYNCH *et al.*, 1999). En effet, un prétraitement chez les HEKLT1 avec la toxine PTX n'a eu aucun effet sur l'activation du promoteur VEGF par LTD<sub>4</sub> en

essai luciférase et les récepteurs des cysLTs n'ont jamais été montrés comme étant couplés à d'autres protéines G que  $G\alpha_{i/o}$  et  $G\alpha_{q/11}$  (ROVATI et CAPRA, 2007).

Les résultats suivants ne sont pas inclut dans l'article publié mais nous en faisons quand même mention ici à des fins de discussion.

Premièrement, nous avons utilisé un chélateur du calcium intracellulaire et constaté que la libération du calcium est nécessaire à l'activation du promoteur du VEGF (environ 75%), tout comme la PI3K (55%) et PKC via l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques. Même si nous ne l'avons pas investigué, la relâche du calcium intracellulaire a fort probablement lieu par la voie  $G\alpha_{q/11}/PLC/InsP_3$  tel que classiquement démontré (LANDRY *et al.*, 2006). Par contre, l'activation de PI3K est plus difficile à expliquer. En effet, il existe différentes classes de PI3K (l'inhibiteur utilisé ici ne fait pas la distinction entre elles): la classe A est ubiquiste et activable par des récepteurs tyrosines kinases tandis que la classe B est surtout présente chez les leucocytes et est activable par des GPCRs via par exemple la sous-unité  $\beta\gamma$  (VANHAESEBROECK et WATERFIELD, 1999). Puisque les sous-unité  $\beta\gamma$  provenant de protéine G couplé à  $G\alpha_{q/11}$  (contrairement à  $G\alpha_{i/o}$ ) sont connues comme étant de mauvais second messenger (LANDRY *et al.*, 2006) et que les HEKLT1 ne sont pas des leucocytes, nous avons émis l'hypothèse de la transactivation d'un récepteur tyrosine kinase activant la PI3K de classe A. En fait, il existe des exemples dans la littérature montrant l'implication des cysLTs et leur récepteur dans la transactivation de EGFR (via CysLT1) (RAVASI *et al.*, 2006) et PDGFR (via CysLT2) (MCMAHON *et al.*, 2002). De plus, dans la même étude de Ravasi, la transactivation de PDGR par CysLT2 peut activer la PI3K via le recrutement de la sous-unité p85 au RTK et mener à l'activation de Ras. La transactivation des récepteurs

tyrosines kinases est un processus de coopération entre deux récepteurs (RTK et GPCR) menant à l'activation du RTK, suivi de l'activation de voies de signalisation intracellulaire que l'on penserait seulement attribuables à l'activation du GPCR (DELCOURT *et al.*, 2007, PIIPER et ZEUZEM, 2004). Ici, l'hypothétique transactivation pourrait par exemple être réalisée via le calcium intracellulaire relâché et/ou des tyrosine kinases, des PKCs ou l'induction d'une métalloprotéase suivit du clivage de ligands (ex : HB-EGF, PGDF) (PIIPER et ZEUZEM, 2004). Fait intéressant, un prétraitement avec un inhibiteur des tyrosine kinase (Genistein) a bloqué l'activation du promoteur du VEGF d'environ 50%, menant ainsi à l'hypothèse du rôle de transactivation d'un RTK par une (ou des) protéine tyrosine kinase (ex : Src) ou plus probablement d'une tyrosine kinase dépendante du calcium (ex : Pyk2) puisque le calcium joue un grand rôle. De plus, une étude de notre laboratoire a récemment montrée que l'interaction LTD<sub>4</sub>/CysLT<sub>1</sub> menait à l'induction de la proprotéine convertase furine, elle-même impliquée dans le clivage et l'activation de plusieurs protéines qui pourraient potentiellement être impliquées dans un phénomène de transactivation (MT1-MMP→MMP2→HB-EGF, PDGF) (THOMPSON *et al.*, 2008). Cependant, il faudrait tout de même pousser plus loin l'investigation à propos de la transactivation d'un RTK comme par exemple en vérifiant l'état de phosphorylation des RTKs que l'on croit impliqués, utiliser des inhibiteurs de l'activation de récepteur tyrosine kinase tels PDGFRb (AG1296) et EGFR (AG1478), utiliser des inhibiteurs spécifiques de tyrosines kinase (ex :Pyk2) ou des siRNA ciblant les mêmes molécules. Ensuite, puisque l'inhibiteur utilisé pour bloquer les PKCs ne fait pas la distinction entre les différentes classes existantes, qu'il semble rester une capacité d'activation résiduelle malgré le chélateur de calcium et que l'inhibiteur des PKCs bloque partiellement la réponse (environ 30%), nous pouvons émettre l'hypothèse que des isoformes dépendantes

du  $\text{Ca}^{2+}$  des PKCs tels PKC $\delta$  et PKC $\zeta$  sont impliquées dans l'activation de Sp1 (des exemples les impliquent dans l'induction du VEGF comme montré plus haut). Enfin, nous ne pouvons pas exclure un rôle des PKCs dans la transactivation d'un RTK. Bien sûr, la prochaine étape serait d'utiliser des inhibiteurs spécifiques pour les différents isoformes ou encore utiliser des siRNA.

Bref, ces résultats montrent qu'en plus d'être probablement activé par les MAPKs, le facteur de transcription Sp1 pourrait être activé par la PI3K ou des PKCs dans le contexte de la modulation du VEGF via les cysLTs. Ces voies de signalisation seraient activées par la liaison de LTD<sub>4</sub> à CysLT1, impliqueraient la protéine G $\alpha_{q/11}$ , la relâche de calcium intracellulaire et possiblement la transactivation d'un RTK via un ou des protéines tyrosine kinases dépendante du calcium. Évidemment, ces hypothèses nécessitent d'être confirmées ou rejetées par différents moyens, comme par exemple vérifier l'état de phosphorylation de Sp1 avec ou sans un prétraitement avec des inhibiteurs pharmacologiques ou des siRNA de protéines que l'on croit impliquées dans son activation.

## 6- CONCLUSION

Ce projet de maîtrise avait pour but d'évaluer l'implication des cysLTs dans la modulation du facteur angiogénique VEGF et d'analyser la signalisation intracellulaire impliquée par l'activation des récepteurs CysLT1 ou CysLT2.

Premièrement, nous pouvons affirmer que le cysteinyl-leucotriène LTD<sub>4</sub> via son activation de CysLT1 peut induire l'expression de l'ARNm et de la protéine du VEGF chez deux types cellulaires importants dans le phénomène du remodelage des voies respiratoires de l'asthme, les monocytes et les cellules musculaires lisses bronchiques.

Deuxièmement, nous avons démontré que chez nos deux modèles cellulaires, soit HEKLT1 et HEKLT2 exprimant uniquement CysLT1 ou CysLT2, respectivement, les cysLTs peuvent aussi moduler à la hausse l'ARNm et la protéine du VEGF.

Au niveau de la transduction du signal ayant un rôle dans la modulation du VEGF par les cysLTs, nous avons démontré que le facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  n'est pas impliqué en situation de normoxie chez les HEKLT1 stimulé par LTD<sub>4</sub>. De plus, nous avons montré que le facteur de transcription essentiel serait Sp1 autant chez les HEKLT1, HEKLT2 que chez les monocytes. En utilisant les HEKLT1, nous avons émis l'hypothèse que Sp1 est probablement activé par les MAPKs ERK et JNK, mais pas p38. Un rôle du complexe AP-1 a également été démontré et nous avons proposé qu'il pourrait agir en synergie ou comme superactivateur de Sp1. Finalement, nous avons montré que la modulation du VEGF par LTD<sub>4</sub> chez les HEKLT1 est PTX-résistant.

D'un point de vue plus hypothétique, nous avons montré que Sp1 pourrait possiblement être activé par PI3K et PKC d'une façon dépendante de la relâche de calcium

intracellulaire suivi d'un phénomène de transactivation d'un récepteur tyrosine kinase par une ou des tyrosines kinases solubles.

Bref, ces résultats suggèrent pour la première fois un rôle des cysLTs dans la modulation du VEGF et pourrait être pertinent au niveau de la pathophysiologie du remodelage des voies respiratoires dans l'asthme. De plus, ces résultats proposent un bénéfice jusqu'à maintenant insoupçonné dans l'utilisation des antagonistes du récepteur CysLT1 dans le traitement de l'asthme ou d'autres pathologies impliquant un processus angiogénique et impliquant les cysLTs, tels le cancer colorectal et l'athérosclérose.



## 7- REMERCIEMENTS

Je voudrais premièrement remercier Dr. Marek Rola-Pleszczynski de m'avoir accepté dans son laboratoire pour mon M.D. M.Sc.. D'abord en m'offrant un projet stimulant et intéressant et ensuite parce qu'il m'a supporté et qu'il a été compréhensif tout au long de ces deux années, Dr. Pleszczynski est au coeur de la réussite de mon projet.

Merci aussi à ma co-directrice Dr. Claire M Dubois pour son aide du point de vue scientifique et pour ses commentaires pertinents pour la rédaction de l'article.

Je tiens également à remercier tout spécialement Dr. Jana Stankova pour son soutien, ses commentaires toujours constructifs et formateurs, et d'avoir été l'une des deux personnes, avec Dr. Pleszczynski, qui m'a fait découvrir et adorer l'immunologie.

Merci à Charles Thompson d'avoir «défriché le terrain» de mon projet avant que j'arrive.

Un énorme merci aux deux piliers essentiels du laboratoire, Sylvie Turcotte et Maryse Thivierge, pour leur formation très appréciée au tout début, leurs conseils et leur aide dans diverses expériences.

Merci à toute l'équipe du laboratoire de Dr. Pleszczynski et Dr. Stankova ayant travaillé avec moi pendant mon bref passage. Merci particulièrement à Geneviève, sans qui les problèmes rencontrés pendant ma maîtrise n'auraient fort probablement pas été aussi bien résolus.

Merci à tous pour les bons moments !

Finalement, merci à mes parents, ma soeur et ma copine pour leur support qui a été très important pour moi.

## 8- LISTE DES RÉFÉRENCES

- Aaron, S.D., et al. Overdiagnosis of asthma in obese and nonobese adults. *CMAJ*; 2008;179(11):1121-31.
- Abdel-Rahman, A.M., et al. A comparative study of two angiogenic factors: vascular endothelial growth factor and angiogenin in induced sputum from asthmatic children in acute attack. *Chest*; 2006;129(2):266-71.
- Akiri, G., et al. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is mediated by internal initiation of translation and alternative initiation of transcription. *Oncogene*; 1998;17(2):227-36.
- Algire, M.A. and J.R. Lorsch. Where to begin? The mechanism of translation initiation codon selection in eukaryotes. *Curr Opin Chem Biol*; 2006;10(5):480-6.
- Arriba-Mendez, S., et al. 927T>C polymorphism of the cysteinyl-leukotriene type-1 receptor (CYSLTR1) gene in children with asthma and atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol*; 2006;17(5):323-8.
- Asai, K., et al. Increased levels of vascular endothelial growth factor in induced sputum in asthmatic patients. *Clin Exp Allergy*; 2003;33(5):595-9.
- Asai, K., et al. Imbalance between vascular endothelial growth factor and endostatin levels in induced sputum from asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol*; 2002;110(4):571-5.
- Atakan, A., et al. Renal protective effects of leukotriene receptor blockers in an experimental model of cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant Proc*; 2008;40(1):279-84.

- Atsuta, H., et al. Effects of a stable prostacyclin analogue beraprost sodium on VEGF and PAI-1 gene expression in vascular smooth muscle cells. *Int J Cardiol*; 2009;132(3):411-8.
- Austen, K.F. The cysteinyl leukotrienes: where do they come from? What are they? Where are they going? *Nat Immunol*; 2008;9(2):113-5.
- Austen, K.F. and W.E. Brocklehurst. Anaphylaxis in chopped guinea pig lung. II. Enhancement of the anaphylactic release of histamine and slow reacting substance by certain dibasic aliphatic acids and inhibition by monobasic fatty acids. *J Exp Med*; 1961;113:541-57.
- Back, M. Functional characteristics of cysteinyl-leukotriene receptor subtypes. *Life Sci*; 2002;71(6):611-22.
- Back, M., et al. Prostacyclin modulation of contractions of the human pulmonary artery by cysteinyl-leukotrienes. *Eur J Pharmacol*; 2000;401(3):389-95.
- Bae, M.K., et al. Jab1 interacts directly with HIF-1alpha and regulates its stability. *J Biol Chem*; 2002;277(1):9-12.
- Bakiri, L., et al. Promoter specificity and biological activity of tethered AP-1 dimers. *Mol Cell Biol*; 2002;22(13):4952-64.
- Bandeira-Melo, C. and P.F. Weller. Eosinophils and cysteinyl leukotrienes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*; 2003;69(2-3):135-43.
- Bandeira-Melo, C., et al. Intracrine cysteinyl leukotriene receptor-mediated signaling of eosinophil vesicular transport-mediated interleukin-4 secretion. *J Exp Med*; 2002;196(6):841-50.

- Barnes, P.J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol*; 2008;8(3):183-92.
- Basu, A., et al. Overexpression of vascular endothelial growth factor and the development of post-transplantation cancer. *Cancer Res*; 2008;68(14):5689-98.
- Bautz, F., et al. Chemotaxis and transendothelial migration of CD34(+) hematopoietic progenitor cells induced by the inflammatory mediator leukotriene D4 are mediated by the 7-transmembrane receptor CysLT1. *Blood*; 2001;97(11):3433-40.
- Bergeron, C. and L.P. Boulet. Structural changes in airway diseases: characteristics, mechanisms, consequences, and pharmacologic modulation. *Chest*; 2006;129(4):1068-87.
- Bhattacharya, M., et al. Localization of functional prostaglandin E2 receptors EP3 and EP4 in the nuclear envelope. *J Biol Chem*; 1999;274(22):15719-24.
- Bindslev, N. A homotropic two-state model and auto-antagonism. *BMC Pharmacol*; 2004;4:11.
- Bisgaard, H., et al. Intermittent inhaled corticosteroids in infants with episodic wheezing. *N Engl J Med*; 2006;354(19):1998-2005.
- Blaudschun, R., et al. Vascular endothelial growth factor causally contributes to the angiogenic response upon ultraviolet B irradiation in vivo. *Br J Dermatol*; 2002;146(4):581-7.

- Blume, S.W., et al. Mithramycin inhibits SP1 binding and selectively inhibits transcriptional activity of the dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo. *J Clin Invest*; 1991;88(5):1613-21.
- Bosse, Y., et al. Airway wall remodeling in asthma: from the epithelial layer to the adventitia. *Curr Allergy Asthma Rep*; 2008;8(4):357-66.
- Bosse, Y., et al. Leukotriene D4-induced, epithelial cell-derived transforming growth factor beta1 in human bronchial smooth muscle cell proliferation. *Clin Exp Allergy*; 2008;38(1):113-21.
- Bradbury, D., et al. Vascular endothelial growth factor induction by prostaglandin E2 in human airway smooth muscle cells is mediated by E prostanoid EP2/EP4 receptors and SP-1 transcription factor binding sites. *J Biol Chem*; 2005;280(34):29993-30000.
- Bradding, P., et al. The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol*; 2006;117(6):1277-84.
- Brahimi-Horn, C., et al. Signalling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modifications. *Cell Signal*; 2005;17(1):1-9.
- Breen, E.C. VEGF in biological control. *J Cell Biochem*; 2007;102(6):1358-67.
- Busse, W.W. and R.F. Lemanske, Jr. Asthma. *N Engl J Med*; 2001;344(5):350-62.
- Capra, V. Molecular and functional aspects of human cysteinyl leukotriene receptors. *Pharmacol Res*; 2004;50(1):1-11.
- Capra, V., et al. Identification and characterization of two cysteinyl-leukotriene high affinity binding sites with receptor characteristics in human lung parenchyma. *Mol Pharmacol*; 1998;53(4):750-8.

- Capra, V., et al. CysLT1 signal transduction in differentiated U937 cells involves the activation of the small GTP-binding protein Ras. *Biochem Pharmacol*; 2004;67(8):1569-77.
- Capra, V., et al. Cysteinyl-leukotrienes and their receptors in asthma and other inflammatory diseases: critical update and emerging trends. *Med Res Rev*; 2007;27(4):469-527.
- Carmeliet, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*; 2005;438(7070):932-6.
- Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*; 2000;6(4):389-95.
- Carmeliet, P., et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*; 1996;380(6573):435-9.
- Chang, L. and M. Karin. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*; 2001;410(6824):37-40.
- Chetta, A., et al. Vascular endothelial growth factor up-regulation and bronchial wall remodelling in asthma. *Clin Exp Allergy*; 2005;35(11):1437-42.
- Chetta, A., et al. Therapeutic approach to vascular remodelling in asthma. *Pulm Pharmacol Ther*; 2007;20(1):1-8.
- Chibana, K., et al. Up-regulation of cysteinyl leukotriene 1 receptor by IL-13 enables human lung fibroblasts to respond to leukotriene C4 and produce eotaxin. *J Immunol*; 2003;170(8):4290-5.

- Cho, J., et al. Hypoxic activation of unoccupied estrogen-receptor-alpha is mediated by hypoxia-inducible factor-1 alpha. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 2006;100(1-3):18-23.
- Chu, S. and T.J. Ferro. Sp1: regulation of gene expression by phosphorylation. *Gene*; 2005;348:1-11.
- Ciana, P., et al. The orphan receptor GPR17 identified as a new dual uracil nucleotides/cysteinyl-leukotrienes receptor. *EMBO J*; 2006;25(19):4615-27.
- Cohen, S.G. Asthma in antiquity: the Ebers Papyrus. *Allergy Proc*; 1992;13(3):147-54.
- Connolly, D.T., et al. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest*; 1989;84(5):1470-8.
- Dahlen, S.E., et al. Allergen challenge of lung tissue from asthmatics elicits bronchial contraction that correlates with the release of leukotrienes C4, D4, and E4. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 1983;80(6):1712-6.
- Damert, A., et al. Activator-protein-1 binding potentiates the hypoxia-inducible factor-1-mediated hypoxia-induced transcriptional activation of vascular-endothelial growth factor expression in C6 glioma cells. *Biochem J*; 1997;327 ( Pt 2):419-23.
- Davies, D.E., et al. Airway remodeling in asthma: new insights. *J Allergy Clin Immunol*; 2003;111(2):215-25; quiz 226.
- Delcourt, N., et al. GPCR-jacking: from a new route in RTK signalling to a new concept in GPCR activation. *Trends Pharmacol Sci*; 2007;28(12):602-7.
- Devillier, P., et al. Leukotrienes, leukotriene receptor antagonists and leukotriene synthesis inhibitors in asthma: an update. Part II: clinical studies with

- leukotriene receptor antagonists and leukotriene synthesis inhibitors in asthma. *Pharmacol Res*; 1999;40(1):15-29.
- Diaz, B.L. and J.P. Arm. Phospholipase A(2). Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids; 2003;69(2-3):87-97.
- Diaz, B.V., et al. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes by retinoids. *J Biol Chem*; 2000;275(1):642-50.
- Doherty, T. and D. Broide. Cytokines and growth factors in airway remodeling in asthma. *Curr Opin Immunol*; 2007;19(6):676-80.
- Dong, C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol*; 2008;8(5):337-48.
- Drazen, J.M. Inhalation challenge with sulfidopeptide leukotrienes in human subjects. *Chest*; 1986;89(3):414-9.
- Dunnill, M.S. The pathology of asthma, with special reference to changes in the bronchial mucosa. *J Clin Pathol*; 1960;13:27-33.
- Early, S.B., et al. Concordant modulation of cysteinyl leukotriene receptor expression by IL-4 and IFN-gamma on peripheral immune cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 2007;36(6):715-20.
- Ehrmann, R.L. and M. Knoth. Choriocarcinoma. Transfilter stimulation of vasoproliferation in the hamster cheek pouch. Studied by light and electron microscopy. *J Natl Cancer Inst*; 1968;41(6):1329-41.
- Eriksson, M. AP-1 transcription factor in cell differentiation and survival. Helsinki University Biomedical Dissertation; 2005;66.



- Espinosa, K., et al. CysLT1 receptor upregulation by TGF-beta and IL-13 is associated with bronchial smooth muscle cell proliferation in response to LTD4. *J Allergy Clin Immunol*; 2003;111(5):1032-40.
- Evans, J.F. Cysteinyl leukotriene receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*; 2002;68-69:587-97.
- Feldberg, W. and C.H. Kellaway. Liberation of histamine and formation of lysocithin-like substances by cobra venom. *J Physiol*; 1938;94(2):187-226.
- Feltis, B.N., et al. Increased vascular endothelial growth factor and receptors: relationship to angiogenesis in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*; 2006;173(11):1201-7.
- Fernandes, D., et al. Glucocorticoids inhibit proliferation, cyclin D1 expression, and retinoblastoma protein phosphorylation, but not activity of the extracellular-regulated kinases in human cultured airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 1999;21(1):77-88.
- Ferrara, N., et al. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*; 2003;9(6):669-76.
- Ferrara, N. and W.J. Henzel. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 1989;161(2):851-8.
- Ferrara, N. and R.S. Kerbel. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*; 2005;438(7070):967-74.
- Figueroa, D.J., et al. Expression of the cysteinyl leukotriene 1 receptor in normal human lung and peripheral blood leukocytes. *Am J Respir Crit Care Med*; 2001;163(1):226-33.

- Finkenzeller, G., et al. Sp1 recognition sites in the proximal promoter of the human vascular endothelial growth factor gene are essential for platelet-derived growth factor-induced gene expression. *Oncogene*; 1997;15(6):669-76.
- Flamand, N., et al. Leukotrienes: mediators that have been typecast as villains. *Cell Mol Life Sci*; 2007;64(19-20):2657-70.
- Foley, S.C., et al. Increased expression of ADAM33 and ADAM8 with disease progression in asthma. *J Allergy Clin Immunol*; 2007;119(4):863-71.
- Fong, G.H., et al. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development*; 1999;126(13):3015-25.
- Fouty, B., et al. Dexamethasone can stimulate G1-S phase transition in human airway fibroblasts in asthma. *Eur Respir J*; 2006;27(6):1160-7.
- Fujii, M., et al. Interferon-gamma up-regulates expression of cysteinyl leukotriene type 2 receptors on eosinophils in asthmatic patients. *Chest*; 2005;128(5):3148-55.
- Gajewska, B.U., et al. GM-CSF and dendritic cells in allergic airway inflammation: basic mechanisms and prospects for therapeutic intervention. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*; 2003;2(4):279-92.
- Gerber, H.P., et al. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem*; 1997;272(38):23659-67.
- Geretti, E., et al. Neuropilin structure governs VEGF and semaphorin binding and regulates angiogenesis. *Angiogenesis*; 2008;11(1):31-9.

- Gothie, E., et al. Identification of alternative spliced variants of human hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *J Biol Chem*; 2000;275(10):6922-7.
- Green, S.A., et al. Increase in urinary leukotriene LTE<sub>4</sub> levels in acute asthma: correlation with airflow limitation. *Thorax*; 2004;59(2):100-4.
- Greenblatt, M. and P. Shubi. Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J Natl Cancer Inst*; 1968;41(1):111-24.
- Guilbert, T.W., et al. Long-term inhaled corticosteroids in preschool children at high risk for asthma. *N Engl J Med*; 2006;354(19):1985-97.
- Gutkind, J.S. Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors. *Sci STKE*; 2000;2000(40):RE1.
- Haldar, P. and I.D. Pavord. Noneosinophilic asthma: a distinct clinical and pathologic phenotype. *J Allergy Clin Immunol*; 2007;119(5):1043-52; quiz 1053-4.
- Hao, L., et al. The cysteinyl-leukotriene type 1 receptor polymorphism 927T/C is associated with atopy severity but not with asthma. *Clin Exp Allergy*; 2006;36(6):735-41.
- Hasaneen, N.A., et al. Angiogenesis is induced by airway smooth muscle strain. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 2007;293(4):L1059-68.
- Hashimoto, K., et al. Cysteinyl Leukotrienes Induce Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Human Monocyte/Macrophages via Mitogen-Activated Protein Kinase and Nuclear Factor- $\kappa$ B Pathways. *Int Arch Allergy Immunol*; 2009;149(3):275-282.

- Heil, M., et al. Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. *J Cell Mol Med*; 2006;10(1):45-55.
- Heise, C.E., et al. Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. *J Biol Chem*; 2000;275(39):30531-6.
- Hellen, C.U. and P. Sarnow. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev*; 2001;15(13):1593-612.
- Henderson, W.R., Jr., et al. Reversal of allergen-induced airway remodeling by CysLT1 receptor blockade. *Am J Respir Crit Care Med*; 2006;173(7):718-28.
- Henderson, W.R., Jr., et al. A role for cysteinyl leukotrienes in airway remodeling in a mouse asthma model. *Am J Respir Crit Care Med*; 2002;165(1):108-16.
- Hess, J., et al. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci*; 2004;117(Pt 25):5965-73.
- Holgate, S.T. Airway inflammation and remodeling in asthma: current concepts. *Mol Biotechnol*; 2002;22(2):179-89.
- Holgate, S.T. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy*; 2008;38(6):872-97.
- Holgate, S.T. The airway epithelium is central to the pathogenesis of asthma. *Allergol Int*; 2008;57(1):1-10.
- Holgate, S.T., et al. Epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol*; 2000;105(2 Pt 1):193-204.
- Holgate, S.T., et al. Understanding the pathophysiology of severe asthma to generate new therapeutic opportunities. *J Allergy Clin Immunol*; 2006;117(3):496-506; quiz 507.

- Holgate, S.T., et al. Roles of cysteinyl leukotrienes in airway inflammation, smooth muscle function, and remodeling. *J Allergy Clin Immunol*; 2003;111(1 Suppl):S18-34; discussion S34-6.
- Holgate, S.T. and R. Polosa. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol*; 2008;8(3):218-30.
- Holmes, D.I. and I. Zachary. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biol*; 2005;6(2):209.
- Homer, R.J. and J.A. Elias. Airway remodeling in asthma: therapeutic implications of mechanisms. *Physiology (Bethesda)*; 2005;20:28-35.
- Hoshino, M., et al. Leukotriene D4 activates mitogen-activated protein kinase through a protein kinase Calpha-Raf-1-dependent pathway in human monocytic leukemia THP-1 cells. *J Biol Chem*; 1998;273(9):4878-82.
- Hoshino, M., et al. Gene expression of vascular endothelial growth factor and its receptors and angiogenesis in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol*; 2001;107(6):1034-8.
- Hoshino, M., et al. Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin immunoreactivity in asthmatic airways and its relationship to angiogenesis. *J Allergy Clin Immunol*; 2001;107(2):295-301.
- Hossny, E., et al. Vascular endothelial growth factor overexpression in induced sputum of children with bronchial asthma. *Pediatr Allergy Immunol*; 2009;20(1):89-96.
- Hui, Y. and C.D. Funk. Cysteinyl leukotriene receptors. *Biochem Pharmacol*; 2002;64(11):1549-57.

Humrich, J.Y., et al. Mature monocyte-derived dendritic cells respond more strongly to CCL19 than to CXCL12: consequences for directional migration.

Immunology; 2006;117(2):238-47.

James, A.J., et al. Human bronchial fibroblasts express the 5-lipoxygenase pathway.

Respir Res; 2006;7:102.

Jiang, B.H., et al. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling mediates angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in endothelial cells. Proc Natl

Acad Sci U S A; 2000;97(4):1749-53.

Jiang, Y., et al. CysLT2 receptors interact with CysLT1 receptors and down-modulate cysteinyl leukotriene dependent mitogenic responses of mast cells. Blood;

2007;110(9):3263-70.

Johnson, P.R., et al. The production of extracellular matrix proteins by human passively sensitized airway smooth-muscle cells in culture: the effect of beclomethasone. Am J Respir Crit Care Med; 2000;162(6):2145-51.

Josko, J. and M. Mazurek. Transcription factors having impact on vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression in angiogenesis. Med Sci Monit;

2004;10(4):RA89-98.

Kaminska, B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. Biochim

Biophys Acta; 2005;1754(1-2):253-62.

Kamio, K., et al. Prostacyclin analogs stimulate VEGF production from human lung fibroblasts in culture. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol;

2008;294(6):L1226-32.

- Kanaoka, Y. and J.A. Boyce. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: cellular distribution and function in immune and inflammatory responses. *J Immunol*; 2004;173(3):1503-10.
- Kanayasu, T., et al. Leukotriene C4 stimulates angiogenesis in bovine carotid artery endothelial cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*; 1989;159(2):572-8.
- Kanazawa, H., et al. Effects of pranlukast administration on vascular endothelial growth factor levels in asthmatic patients. *Chest*; 2004;125(5):1700-5.
- Kardassis, D., et al. c-Jun transactivates the promoter of the human p21(WAF1/Cip1) gene by acting as a superactivator of the ubiquitous transcription factor Sp1. *J Biol Chem*; 1999;274(41):29572-81.
- Kawasaki, T., et al. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development*; 1999;126(21):4895-902.
- Ke, Q. and M. Costa. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol*; 2006;70(5):1469-80.
- Kelly, M.M., et al. Montelukast treatment attenuates the increase in myofibroblasts following low-dose allergen challenge. *Chest*; 2006;130(3):741-53.
- Kiley, J., et al. Asthma phenotypes. *Curr Opin Pulm Med*; 2007;13(1):19-23.
- Kimura, H., et al. Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood*; 2000;95(1):189-97.

- Knight, D.A., et al. Does aberrant activation of the epithelial-mesenchymal trophic unit play a key role in asthma or is it an unimportant sideshow? *Curr Opin Pharmacol*; 2004;4(3):251-6.
- Koura, A.N., et al. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon carcinoma cells by cell density. *Cancer Res*; 1996;56(17):3891-4.
- Koyasu, S. The role of PI3K in immune cells. *Nat Immunol*; 2003;4(4):313-9.
- Kraft, M. The distal airways: are they important in asthma? *Eur Respir J*; 1999;14(6):1403-17.
- Kraft, M., et al. IL-4, IL-13, and dexamethasone augment fibroblast proliferation in asthma. *J Allergy Clin Immunol*; 2001;107(4):602-6.
- Krasilnikov, M.A. Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways: the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation. *Biochemistry (Mosc)*; 2000;65(1):59-67.
- Laitinen, L.A., et al. Leukotriene E4 and granulocytic infiltration into asthmatic airways. *Lancet*; 1993;341(8851):989-90.
- Lam, S., et al. Release of leukotrienes in patients with bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol*; 1988;81(4):711-7.
- Lamoureux, J., et al. Leukotriene D4 enhances immunoglobulin production in CD40-activated human B lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol*; 2006;117(4):924-30.
- Landry, Y., et al. Heptahelical and other G-protein-coupled receptors (GPCRs) signaling. *Curr Med Chem*; 2006;13(1):51-63.



- Laughner, E., et al. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol*; 2001;21(12):3995-4004.
- Lazaar, A.L., et al. T lymphocytes adhere to airway smooth muscle cells via integrins and CD44 and induce smooth muscle cell DNA synthesis. *J Exp Med*; 1994;180(3):807-16.
- Lecca, D., et al. The recently identified P2Y-like receptor GPR17 is a sensor of brain damage and a new target for brain repair. *PLoS ONE*; 2008;3(10):e3579.
- Lee, C.G., et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung. *Nat Med*; 2004;10(10):1095-103.
- Lee, J.W., et al. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med*; 2004;36(1):1-12.
- Lee, K.S., et al. Cysteinyl leukotriene receptor antagonist regulates vascular permeability by reducing vascular endothelial growth factor expression. *J Allergy Clin Immunol*; 2004;114(5):1093-9.
- Lee, T.H., et al. Leukotriene E4-induced airway hyperresponsiveness of guinea pig tracheal smooth muscle to histamine and evidence for three separate sulfidopeptide leukotriene receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 1984;81(15):4922-5.
- Leung, D.W., et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*; 1989;246(4935):1306-9.

- Levy, B.D., et al. Diminished lipoxin biosynthesis in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*; 2005;172(7):824-30.
- Levy, N.S., et al. Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem*; 1998;273(11):6417-23.
- Li, X. and J.W. Wilson. Increased vascularity of the bronchial mucosa in mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med*; 1997;156(1):229-33.
- Liu, Y., et al. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res*; 1995;77(3):638-43.
- Lynch, K.R., et al. Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nature*; 1999;399(6738):789-93.
- Macfarlane, A.J., et al. Sputum cysteinyl leukotrienes increase 24 hours after allergen inhalation in atopic asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med*; 2000;161(5):1553-8.
- Machida, I., et al. Cysteinyl leukotrienes regulate dendritic cell functions in a murine model of asthma. *J Immunol*; 2004;172(3):1833-8.
- Mackay, H.J. and C.J. Twelves. Targeting the protein kinase C family: are we there yet? *Nat Rev Cancer*; 2007;7(7):554-62.
- Maeno, T., et al. Stimulation of vascular endothelial growth factor gene transcription by all trans retinoic acid through Sp1 and Sp3 sites in human bronchioloalveolar carcinoma cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 2002;26(2):246-53.

- Magnusson, C., et al. An increased expression of cysteinyl leukotriene 2 receptor in colorectal adenocarcinomas correlates with high differentiation. *Cancer Res*; 2007;67(19):9190-8.
- Marketos, S. and C. Ballas. Bronchial asthma in medical literature of Greek antiquity. *Hist Sci Med*; 1982;17(Spec 2):35-9.
- Marone, G., et al. Mast cells and basophils: friends as well as foes in bronchial asthma? *Trends Immunol*; 2005;26(1):25-31.
- Mauad, T., et al. Asthma therapy and airway remodeling. *J Allergy Clin Immunol*; 2007;120(5):997-1009; quiz 1010-1.
- McCudden, C.R., et al. G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol Life Sci*; 2005;62(5):551-77.
- McMahon, B., et al. Lipoxin, leukotriene, and PDGF receptors cross-talk to regulate mesangial cell proliferation. *FASEB J*; 2002;16(13):1817-9.
- McMahon, B., et al. Lipoxin A4 antagonizes the mitogenic effects of leukotriene D4 in human renal mesangial cells. Differential activation of MAP kinases through distinct receptors. *J Biol Chem*; 2000;275(36):27566-75.
- Medoff, B.D., et al. T cell trafficking in allergic asthma: the ins and outs. *Annu Rev Immunol*; 2008;26:205-32.
- Mellor, E.A., et al. Expression of the type 2 receptor for cysteinyl leukotrienes (CysLT2R) by human mast cells: Functional distinction from CysLT1R. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 2003;100(20):11589-93.
- Meyer, E.H., et al. T cells and NKT cells in the pathogenesis of asthma. *Annu Rev Med*; 2008;59:281-92.

Milanini, J., et al. p42/p44 MAP kinase module plays a key role in the transcriptional regulation of the vascular endothelial growth factor gene in fibroblasts. *J Biol Chem*; 1998;273(29):18165-72.

Milanini-Mongiat, J., et al. Identification of two Sp1 phosphorylation sites for p42/p44 mitogen-activated protein kinases: their implication in vascular endothelial growth factor gene transcription. *J Biol Chem*; 2002;277(23):20631-9.

Milligan, G., et al. GPCR dimerisation. *Life Sci*; 2003;74(2-3):181-8.

Mizukami, Y., et al. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor through the induction of phosphatidylinositol 3-kinase/Rho/ROCK and c-Myc. *J Biol Chem*; 2006;281(20):13957-63.

Mizukami, Y., et al. Hypoxia-inducible factor-1-independent regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia in colon cancer. *Cancer Res*; 2004;64(5):1765-72.

Morris, H.R., et al. Structure of slow-reacting substance of anaphylaxis from guinea-pig lung. *Nature*; 1980;285(5760):104-6.

Mueller, M.D., et al. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors alpha and beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 2000;97(20):10972-7.

Murray, C.S., et al. Secondary prevention of asthma by the use of Inhaled Fluticasone propionate in Wheezy Infants (IFWIN): double-blind, randomised, controlled study. *Lancet*; 2006;368(9537):754-62.

Murray, M. and N. Nadel. 2005.

- Nabors, L.B., et al. Tumor necrosis factor alpha induces angiogenic factor up-regulation in malignant glioma cells: a role for RNA stabilization and HuR. *Cancer Res*; 2003;63(14):4181-7.
- Nehls, M.C., et al. Mithramycin selectively inhibits collagen-alpha 1(I) gene expression in human fibroblast. *J Clin Invest*; 1993;92(6):2916-21.
- Nicosia, S., et al. Leukotrienes as mediators of asthma. *Pulm Pharmacol Ther*; 2001;14(1):3-19.
- Nielsen, C.K., et al. A novel localization of the G-protein-coupled CysLT1 receptor in the nucleus of colorectal adenocarcinoma cells. *Cancer Res*; 2005;65(3):732-42.
- Nothacker, H.P., et al. Molecular cloning and characterization of a second human cysteinyl leukotriene receptor: discovery of a subtype selective agonist. *Mol Pharmacol*; 2000;58(6):1601-8.
- Noti, J.D., et al. Sp1 binds two sites in the CD11c promoter in vivo specifically in myeloid cells and cooperates with AP1 to activate transcription. *Mol Cell Biol*; 1996;16(6):2940-50.
- Oddera, S., et al. Effects of triamcinolone acetonide on adult human lung fibroblasts: decrease in proliferation, surface molecule expression and mediator release. *Int Arch Allergy Immunol*; 2002;129(2):152-9.
- Onesto, C., et al. Poly(A)-binding protein-interacting protein 2, a strong regulator of vascular endothelial growth factor mRNA. *J Biol Chem*; 2004;279(33):34217-26.

- Otrock, Z.K., et al. Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells Mol Dis*; 2007;39(2):212-20.
- Otrock, Z.K., et al. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood Cells Mol Dis*; 2007;38(3):258-68.
- Owens, D.M. and S.M. Keyse. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene*; 2007;26(22):3203-13.
- Pages, G. and J. Pouyssegur. Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene--a concert of activating factors. *Cardiovasc Res*; 2005;65(3):564-73.
- Pal, S., et al. Activation of Sp1-mediated vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor transcription requires specific interaction with protein kinase C zeta. *J Biol Chem*; 1998;273(41):26277-80.
- Pal, S., et al. Role of protein kinase Czeta in Ras-mediated transcriptional activation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor expression. *J Biol Chem*; 2001;276(4):2395-403.
- Palmer, C.N., et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet*; 2006;38(4):441-6.
- Panettieri, R.A., et al. Effects of LTD4 on human airway smooth muscle cell proliferation, matrix expression, and contraction In vitro: differential sensitivity to cysteinyl leukotriene receptor antagonists. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 1998;19(3):453-61.

- Parikh, A.A. and L.M. Ellis. The vascular endothelial growth factor family and its receptors. *Hematol Oncol Clin North Am*; 2004;18(5):951-71, vii.
- Park, H.K., et al. Distinct association of genetic variations of vascular endothelial growth factor, transforming growth factor-beta, and fibroblast growth factor receptors with atopy and airway hyperresponsiveness. *Allergy*; 2008;63(4):447-53.
- Park, H.W., et al. Association between genetic variations of vascular endothelial growth factor receptor 2 and atopy in the Korean population. *J Allergy Clin Immunol*; 2006;117(4):774-9.
- Paruchuri, S., et al. The pro-inflammatory mediator leukotriene D4 induces phosphatidylinositol 3-kinase and Rac-dependent migration of intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*; 2005;280(14):13538-44.
- Pascual, R.M. and S.P. Peters. Airway remodeling contributes to the progressive loss of lung function in asthma: an overview. *J Allergy Clin Immunol*; 2005;116(3):477-86; quiz 487.
- Patho.
- Pavord, I.D., et al. Induced sputum eicosanoid concentrations in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*; 1999;160(6):1905-9.
- Peters-Golden, M. and T.G. Brock. Intracellular compartmentalization of leukotriene synthesis: unexpected nuclear secrets. *FEBS Lett*; 2001;487(3):323-6.
- Peters-Golden, M., et al. Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. *J Immunol*; 2005;174(2):589-94.

- Peters-Golden, M. and W.R. Henderson, Jr. Leukotrienes. *N Engl J Med*; 2007;357(18):1841-54.
- Piiper, A. and S. Zeuzem. Receptor tyrosine kinases are signaling intermediates of G protein-coupled receptors. *Curr Pharm Des*; 2004;10(28):3539-45.
- Pohunek, P. Can we treat airway remodeling? *Paediatr Respir Rev*; 2006;7 Suppl 1:S108-9.
- Pore, N., et al. Sp1 is involved in Akt-mediated induction of VEGF expression through an HIF-1-independent mechanism. *Mol Biol Cell*; 2004;15(11):4841-53.
- Porreca, E., et al. Cysteinyl leukotriene D4 induced vascular smooth muscle cell proliferation: a possible role in myointimal hyperplasia. *Thromb Haemost*; 1996;76(1):99-104.
- Poulin, S. Le remodelage des voies respiratoires dans l'asthme. *Espaces recherche*; 2008;1:14-18.
- Profita, M., et al. Cysteinyl leukotriene-1 receptor activation in a human bronchial epithelial cell line leads to signal transducer and activator of transcription 1-mediated eosinophil adhesion. *J Pharmacol Exp Ther*; 2008;325(3):1024-30.
- R&D, *Human VEGF Immunoassay*. 2008.
- Raman, M., et al. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*; 2007;26(22):3100-12.
- Ravasi, S., et al. CysLT1 receptor-induced human airway smooth muscle cells proliferation requires ROS generation, EGF receptor transactivation and ERK1/2 phosphorylation. *Respir Res*; 2006;7:42.



- Reisinger, K., et al. Increased Sp1 phosphorylation as a mechanism of hepatocyte growth factor (HGF/SF)-induced vascular endothelial growth factor (VEGF/VPF) transcription. *J Cell Sci*; 2003;116(Pt 2):225-38.
- Riccioni, G., et al. Review: Pharmacological treatment of airway remodeling: inhaled corticosteroids or antileukotrienes? *Ann Clin Lab Sci*; 2004;34(2):138-42.
- Richard, D.E., et al. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem*; 1999;274(46):32631-7.
- Riese, R.J. and H.A. Chapman. Cathepsins and compartmentalization in antigen presentation. *Curr Opin Immunol*; 2000;12(1):107-13.
- Risse, G., et al. Asymmetrical recognition of the palindromic AP1 binding site (TRE) by Fos protein complexes. *EMBO J*; 1989;8(12):3825-32.
- Robbins, *Robbins Basic Pathology*. 7th ed. 2002: W.B. Saunders Company.
- Robinson, C.J. and S.E. Stringer. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci*; 2001;114(Pt 5):853-65.
- Rola-Pleszczynski, M. and J. Stankova. Cytokine-leukotriene receptor interactions. *ScientificWorldJournal*; 2007;7:1348-58.
- Rola-Pleszczynski, M. and J. Stankova. Leukotriene B<sub>4</sub> enhances interleukin-6 (IL-6) production and IL-6 messenger RNA accumulation in human monocytes in vitro: transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Blood*; 1992;80(4):1004-11.
- Rovati, G.E. and V. Capra. Cysteinyl-leukotriene receptors and cellular signals. *ScientificWorldJournal*; 2007;7:1375-92.

- Roy, H., et al. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett*; 2006;580(12):2879-87.
- Ryuto, M., et al. Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha in human glioma cells. Possible roles of SP-1. *J Biol Chem*; 1996;271(45):28220-8.
- Sakuma, T., et al. Expression of vascular endothelial growth factor-A and mRNA stability factor HuR in human meningiomas. *J Neurooncol*; 2008;88(2):143-55.
- Salnikow, K., et al. Depletion of intracellular ascorbate by the carcinogenic metals nickel and cobalt results in the induction of hypoxic stress. *J Biol Chem*; 2004;279(39):40337-44.
- Samuelsson, B., et al. Introduction of a nomenclature: leukotrienes. Prostaglandins; 1979;17(6):785-7.
- Sandau, K.B., et al. Induction of hypoxia-inducible-factor 1 by nitric oxide is mediated via the PI 3K pathway. *Biochem Biophys Res Commun*; 2000;278(1):263-7.
- Sang, N., et al. MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300. *J Biol Chem*; 2003;278(16):14013-9.
- Sanz, C., et al. Analysis of 927T> C CYSLTRI and -444A > C LTC4S polymorphisms in patients with asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol*; 2006;16(6):331-7.
- Sarau, H.M., et al. Identification, molecular cloning, expression, and characterization of a cysteinyl leukotriene receptor. *Mol Pharmacol*; 1999;56(3):657-63.
- Semenza, G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol*; 2002;64(5-6):993-8.

- Semenza, G.L. and G.L. Wang. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*; 1992;12(12):5447-54.
- Senger, D.R., et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*; 1983;219(4587):983-5.
- Shalaby, F., et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*; 1995;376(6535):62-6.
- Shaulian, E. and M. Karin. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*; 2001;20(19):2390-400.
- Simcock, D.E., et al. Induction of angiogenesis by airway smooth muscle from patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*; 2008;178(5):460-8.
- Simcock, D.E., et al. Proangiogenic activity in bronchoalveolar lavage fluid from patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*; 2007;176(2):146-53.
- Soberman, R.J. and P. Christmas. The organization and consequences of eicosanoid signaling. *J Clin Invest*; 2003;111(8):1107-13.
- Sokol, C.L., et al. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat Immunol*; 2008;9(3):310-8.
- Song, Y., et al. Sp-1 and c-Myc mediate lysophosphatidic acid-induced expression of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer cells via a hypoxia-inducible factor-1-independent mechanism. *Clin Cancer Res*; 2009;15(2):492-501.
- Sumi, Y. and Q. Hamid. Airway remodeling in asthma. *Allergol Int*; 2007;56(4):341-8.

- Szeffler, S.J. Airway remodeling: therapeutic target or not? *Am J Respir Crit Care Med*; 2005;171(7):672-3.
- Takasaki, J., et al. The molecular characterization and tissue distribution of the human cysteinyl leukotriene CysLT(2) receptor. *Biochem Biophys Res Commun*; 2000;274(2):316-22.
- Tanaka, T., et al. Induction of VEGF gene transcription by IL-1 beta is mediated through stress-activated MAP kinases and Sp1 sites in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*; 2000;32(11):1955-67.
- Ten Hacken, N.H., et al. Airway remodeling and long-term decline in lung function in asthma. *Curr Opin Pulm Med*; 2003;9(1):9-14.
- Thivierge, M., et al. IL-5 up-regulates cysteinyl leukotriene 1 receptor expression in HL-60 cells differentiated into eosinophils. *J Immunol*; 2000;165(9):5221-6.
- Thivierge, M., et al. IL-13 and IL-4 up-regulate cysteinyl leukotriene 1 receptor expression in human monocytes and macrophages. *J Immunol*; 2001;167(5):2855-60.
- Thivierge, M., et al. Toll-like receptor agonists differentially regulate cysteinyl-leukotriene receptor 1 expression and function in human dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol*; 2006;117(5):1155-62.
- Thompson, C., et al. Signaling by the cysteinyl-leukotriene receptor 2. Involvement in chemokine gene transcription. *J Biol Chem*; 2008;283(4):1974-84.
- Thompson, C., et al. CysLT1 receptor engagement induces activator protein-1- and NF-kappaB-dependent IL-8 expression. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 2006;35(6):697-704.

- Thompson, C., et al. Leukotriene D4 up-regulates furin expression through CysLT1 receptor signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 2008;39(2):227-34.
- Thompson, M.D., et al. A functional G300S variant of the cysteinyl leukotriene 1 receptor is associated with atopy in a Tristan da Cunha isolate. *Pharmacogenet Genomics*; 2007;17(7):539-49.
- Thompson, M.D., et al. A cysteinyl leukotriene 2 receptor variant is associated with atopy in the population of Tristan da Cunha. *Pharmacogenetics*; 2003;13(10):641-9.
- Tian, H., et al. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev*; 1997;11(1):72-82.
- Tischer, E., et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem*; 1991;266(18):11947-54.
- Tliba, O., et al. Is airway smooth muscle the "missing link" modulating airway inflammation in asthma? *Chest*; 2008;133(1):236-42.
- Tsopanoglou, N.E., et al. Leukotrienes C4 and D4 promote angiogenesis via a receptor-mediated interaction. *Eur J Pharmacol*; 1994;258(1-2):151-4.
- Turjanski, A.G., et al. MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene*; 2007;26(22):3240-53.
- Uzonyi, B., et al. Cysteinyl leukotriene 2 receptor and protease-activated receptor 1 activate strongly correlated early genes in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 2006;103(16):6326-31.

- Van Eerdewegh, P., et al. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature*; 2002;418(6896):426-30.
- Vanhaesebroeck, B. and M.D. Waterfield. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res*; 1999;253(1):239-54.
- Vannella, K.M., et al. Cysteinyl leukotrienes are autocrine and paracrine regulators of fibrocyte function. *J Immunol*; 2007;179(11):7883-90.
- von Garnier, C., et al. Anatomical location determines the distribution and function of dendritic cells and other APCs in the respiratory tract. *J Immunol*; 2005;175(3):1609-18.
- Walch, L., et al. Pharmacological evidence for a novel cysteinyl-leukotriene receptor subtype in human pulmonary artery smooth muscle. *Br J Pharmacol*; 2002;137(8):1339-45.
- Walters, E.H., et al. Vascular remodelling in asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*; 2008;8(1):39-43.
- Warner, S.M. and D.A. Knight. Airway modeling and remodeling in the pathogenesis of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*; 2008;8(1):44-8.
- Weidemann, A. and R.S. Johnson. Biology of HIF-1 $\alpha$ . *Cell Death Differ*; 2008;15(4):621-7.
- Weiss, J.W., et al. Bronchoconstrictor effects of leukotriene C in humans. *Science*; 1982;216(4542):196-8.
- Wenzel, S.E., et al. Elevated levels of leukotriene C<sub>4</sub> in bronchoalveolar lavage fluid from atopic asthmatics after endobronchial allergen challenge. *Am Rev Respir Dis*; 1990;142(1):112-9.

- Wierstra, I. Sp1: emerging roles--beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes. *Biochem Biophys Res Commun*; 2008;372(1):1-13.
- Wilson, J.W. and S. Hii. The importance of the airway microvasculature in asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*; 2006;6(1):51-5.
- Woods, S.A., et al. Phosphatidylinositol 3'-kinase and MAPK/ERK kinase 1/2 differentially regulate expression of vascular endothelial growth factor in human malignant astrocytoma cells. *Neuro Oncol*; 2002;4(4):242-52.
- Woszczek, G., et al. IFN-gamma induces cysteinyl leukotriene receptor 2 expression and enhances the responsiveness of human endothelial cells to cysteinyl leukotrienes. *J Immunol*; 2007;178(8):5262-70.
- Woszczek, G., et al. Leukotriene D(4) induces gene expression in human monocytes through cysteinyl leukotriene type I receptor. *J Allergy Clin Immunol*; 2008;121(1):215-221 e1.
- Woszczek, G., et al. Functional characterization of human cysteinyl leukotriene 1 receptor gene structure. *J Immunol*; 2005;175(8):5152-9.
- Wu, Y., et al. c-Jun and the dominant-negative mutant, TAM67, induce vimentin gene expression by interacting with the activator Sp1. *Oncogene*; 2003;22(55):8891-901.
- Xie, K., et al. Constitutive and inducible expression and regulation of vascular endothelial growth factor. *Cytokine Growth Factor Rev*; 2004;15(5):297-324.
- Yang, C. and M.G. Kazanietz. Divergence and complexities in DAG signaling: looking beyond PKC. *Trends Pharmacol Sci*; 2003;24(11):602-8.

- Ying, S., et al. Lack of filaggrin expression in the human bronchial mucosa. *J Allergy Clin Immunol*; 2006;118(6):1386-8.
- Yokomizo, T., et al. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B<sub>4</sub> that mediates chemotaxis. *Nature*; 1997;387(6633):620-4.
- Yoo, P.S., et al. Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor: implications for tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol*; 2006;12(31):4937-42.
- Yuan, L., et al. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development*; 2002;129(20):4797-806.
- Zhang, J., et al. Recent advances in asthma genetics. *Respir Res*; 2008;9:4.
- Zhang, W., et al. Synergistic cooperation between Sp1 and Smad3/Smad4 mediates transforming growth factor beta1 stimulation of alpha 2(I)-collagen (COL1A2) transcription. *J Biol Chem*; 2000;275(50):39237-45.
- Zhang, Y., et al. Synergistic activation of the human adrenomedullin gene promoter by Sp1 and AP-2alpha. *Peptides*; 2008;29(3):465-72.
- Zhong, H., et al. Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res*; 2000;60(6):1541-5.
- Zhou, J., et al. PI3K/Akt is required for heat shock proteins to protect hypoxia-inducible factor 1alpha from pVHL-independent degradation. *J Biol Chem*; 2004;279(14):13506-13.



Zundel, W., et al. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev*; 2000;14(4):391-6.